



TEÓFILO HERNANDO

Instituto Teófilo Hernando de I + D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Efectos pleiotrópicos del agonista nicotínico $\alpha 7$, el PNU282987, y su
posible aplicación en el tratamiento de enfermedades
neurodegenerativas**

Tesis Doctoral
Elisa Navarro González de Mesa

Directora
Manuela García López

Trabajo realizado en el Instituto Teófilo Hernando para la I+D del Medicamento,
Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina, Universidad
Autónoma de Madrid.

Madrid, 2016

Para la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado durante los cursos académicos 2012-2016 de una beca del programa para la Formación de Personal Investigador (FPI) otorgada por la Universidad Autónoma de Madrid.

Los resultados que aquí se presentan han sido financiados gracias a los proyectos SAF2012-23332 y SAF2015-63935-R concedidos por el Ministerio de Economía y Competitividad a la Dra. Manuela García López. También, para la realización de esta Tesis he recibido un constante apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

Resumen/ Abstract

El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disfunción en la señalización colinérgica, pérdida de conectividad sináptica, inflamación sub-crónica y alteraciones en la función y masa mitocondrial, lo que conduce a una menor producción energética y un aumento en el estrés oxidativo, entre otros. El receptor nicotínico alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) se ha postulado en los últimos años como una diana para el tratamiento de estas patologías. En este contexto, nos planteamos ahondar en los efectos celulares derivados de la activación del $\alpha 7$ nAChR (empleando el agonista PNU282987), y sus consecuencias sobre el control de la neuro-inflamación y la neuroprotección.

En esta Tesis demostramos, empleando cultivos organotípicos de hipocampo de rata, cómo una inflamación y un daño mitocondrial sub-crónicos son suficientes para desencadenar de manera sinérgica las alteraciones patológicas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas como son el estrés oxidativo, la proteinopatía y la neurodegeneración; siendo todas estas alteraciones prevenidas a través de la activación del $\alpha 7$ nAChR. Centrándonos en las células gliales, observamos que la activación del $\alpha 7$ nAChR conduce a un incremento en la masa mitocondrial y la capacidad energética celular a través de la activación de la vía Nrf2/HO-1/PGC-1 α . Además, empleando un modelo *in vivo* de neuro-inflamación, demostramos que la activación de los $\alpha 7$ nAChRs centrales revierte el daño inflamatorio; perdiéndose estos efectos en animales envejecidos. Finalmente, evidenciamos que el incremento en masa mitocondrial observado en células gliales tras la activación del $\alpha 7$ nAChR también acontece en cultivos neuronales donde, además, la activación $\alpha 7$ nAChR conduce a un incremento en la densidad y el tamaño de las espinas dendríticas.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral nos han permitido ahondar en el conocimiento de la señalización colinérgica, demostrando por primera vez que la vía de señalización $\alpha 7$ nAChR/Nrf2/HO-1/PGC-1 α conduce a un incremento en la masa mitocondrial tanto en glía como en neuronas, lo cual podría explicar los efectos anti-inflamatorios, sinaptogénicos y neuroprotectores asociados a la activación del $\alpha 7$ nAChR.

Ageing and neurodegeneration are characterized by a dysfunction in cholinergic signaling, loss in synaptic connectivity, sub-chronic inflammation and mitochondrial alterations such as decreased energetic production and higher oxidative stress, among others. The alpha 7 nicotinic receptor ($\alpha 7$ nAChR) is gaining interest as a pharmacological target for the treatment of these diseases. In this context, our objective is to deepen in the cellular effects taking place after the activation of $\alpha 7$ nAChR (using the agonist PNU282987), and to study its consequences in controlling neuroinflammation and neuroprotection.

First of all, using organotypic hippocampal cultures, we demonstrate that sub-chronic low-grade inflammation and mitochondrial dysfunction can trigger synergistically the pathological alterations associated to neurodegenerative diseases: oxidative stress, proteinopathy and neurodegeneration. All these pathological alterations can be prevented by the activation of $\alpha 7$ nAChR. Focusing on glial cells, we describe that the activation of $\alpha 7$ nAChR triggers an increase in mitochondrial mass and cellular bioenergetic capacity *via* the axis Nrf2/HO-1/PGC-1 α . Moreover, using an *in vivo* model of neuroinflammation, we demonstrate how the central activation of $\alpha 7$ nAChRs can reverse the inflammatory damage; being this anti-inflammatory effect lost in aged animals. Finally, we show that the increase in mitochondrial mass and respiration elicited by $\alpha 7$ nAChRs also occurs in neuronal cultures, where $\alpha 7$ nAChR activation produces an increase in the dendritic spine density and in the head size of the dendritic spines.

The results presented in this Thesis have deepened in the knowledge of the cholinergic signaling, demonstrating for the first time that the signaling pathway $\alpha 7$ nAChR/Nrf2/HO-1/PGC-1 α leads to an increase in the mitochondrial mass, both in glial and neuronal cells, which could explain the anti-inflammatory, synaptogenic and neuroprotective effects associated to $\alpha 7$ nACh.

Abreviaturas y acrónimos

Se presentan las abreviaturas y acrónimos empleados en esta Tesis Doctoral por orden alfabético:

- ✓ **α7**: alfa 7
- ✓ **α-Bgtx**: alfa bungarotoxina
- ✓ **AA**: antimicina A
- ✓ **ACh**: acetilcolina
- ✓ **ADN**: ácido desoxirribonucleico
- ✓ **ADNc**: ADN copia
- ✓ **ADNmit**: ADN mitocondrial
- ✓ **ADP**: adenosín difosfato
- ✓ **AMPA**: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- ✓ **AMPK**: cinasa dependiente de adenosín monofosfato
- ✓ **APV**: del inglés DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
- ✓ **APP**: precursor del péptido amiloide
- ✓ **ARE**: *antioxidant response elements* o elementos de respuesta antioxidante
- ✓ **ARN**: ácido ribonucleico
- ✓ **ARNm**: ARN mensajero
- ✓ **ATP**: adenosín trifosfato
- ✓ **BAR**: del inglés *Bin/Amphiphysin/Rvs*
- ✓ **BHE**: barrera hematoencefálica
- ✓ **BSA**: del inglés *bovine serum albumin*
- ✓ **CD11b**: receptor del complemento 3
- ✓ **CO**: monóxido de carbono
- ✓ **CTE**: cadena transportadora de electrons
- ✓ **DHE**: del inglés *dihydroethidium*
- ✓ **DIV**: del inglés *days in vitro*
- ✓ **DMSO**: dimetilsulfóxido
- ✓ **DNP**: dinitrofenol
- ✓ **EA**: enfermedad de Alzheimer
- ✓ **e.e.m.**: error estándar de la media
- ✓ **ELISA**: del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- ✓ **ENDs**: enfermedades neurodegenerativas
- ✓ **EO**: estrés oxidativo
- ✓ **EP**: enfermedad de Parkinson
- ✓ **EpRE**: del inglés *electrophile response elements*
- ✓ **ERM**: esopsectrometría de resonancia magnética
- ✓ **ERN**: especies reactivas de nitrógeno
- ✓ **ERO**: especies reactivas de oxígeno
- ✓ **ERRs**: del inglés *estrogen related receptors*
- ✓ **Fe**: hierro

- ✓ **g**: fuerza gravitacional
- ✓ **GABA**: *gamma-amino butyric acid*
- ✓ **GSK-3 β** : glucógeno sintasa cinasa 3-beta
- ✓ **GTP**: *green fluorescent protein*
- ✓ **H⁺**: protón
- ✓ **HBSS**: del inglés *Hanks balanced salt solution*
- ✓ **HCl**: ácido clorhídrico
- ✓ **H₂DCFDA**: del inglés 2',7' - *Dichlorodihydrofluorescein diacetate*
- ✓ **HLA**: del inglés *human leucocyte antigen*
- ✓ **HO-1**: hemo-oxigenasa 1
- ✓ **H₂O**: agua
- ✓ **i.c.v.**: intracerebroventricular
- ✓ **IL**: interleucina
- ✓ **i.p.**: intraperitoneal
- ✓ **ITH**: Instituto Teófilo Hernando
- ✓ **JAK2**: *jannus cinasa 2*
- ✓ **Kb**: kilobases
- ✓ **Keap1**: del inglés *Kelch-like ECH-associated protein 1*
- ✓ **LPS**: lipopolisacárido bacteriano
- ✓ **MEF**: del inglés *mouse embryonic fibroblast*
- ✓ **MHCII**: complejo II de histocompatibilidad
- ✓ **MPP⁺**: 1-metil-4-fenilpiridinio
- ✓ **MPTP**: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6,-tetrahidropiridina
- ✓ **NAC**: n-Acetil cisteína
- ✓ **nAChR**: receptor nicotínico de acetilcolina
- ✓ **NADH**: nicotín adenín dinuclótido reducido
- ✓ **NGS**: del inglés *normal goat serum*
- ✓ **NMDA**: N-metil-D-aspartato
- ✓ **Nox**: NADPH oxidase
- ✓ **NQO-1**: NADPH quinona oxido-reductasa 1
- ✓ **Nrf2**: del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- ✓ **NRFs**: del inglés *nuclear respiratory factors*
- ✓ **O₂**: oxígeno
- ✓ **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- ✓ **PARIS**: del inglés *Parkin interacting substrate*
- ✓ **PET**: tomografía de emisión de positrones
- ✓ **PGC-1 α** : del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor- γ -co-activator*
- ✓ **PI3K**: fosfatidil inositol 3 cinasa
- ✓ **PKC**: proteínas cinasa C
- ✓ **PPARs**: del inglés *peroxisome proliferator activated receptors*
- ✓ **PS-1**: presenilina 1

- ✓ **PSD:** del inglés *post synaptic density*
- ✓ **qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- ✓ **r.p.m.:** revoluciones por minuto
- ✓ **SBF:** suero bovino fetal
- ✓ **SNC:** sistema nervioso central
- ✓ **SnPP:** protoporfirina-IX de estaño
- ✓ **SOD:** superóxido dismutasa
- ✓ **STAT3:** del inglés *signal transduce and activator of transcription 3*
- ✓ **TCO:** tasa de consumo de oxígeno
- ✓ **TFAM:** del inglés *mitochondrial transcription factor A*
- ✓ **TGF- β :** factor de crecimiento transformante beta
- ✓ **TLRs:** del inglés *Toll like receptors*
- ✓ **TMRE:** del inglés *Tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate*
- ✓ **TNF- α :** factor de necrosis tumoral
- ✓ **TREM2:** del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells*
- ✓ **UAM:** Universidad Autónoma de Madrid

Índice

Contenido

<i>Abreviaturas y acrónimos</i>	13
<i>Índice</i>	19
1. Justificación	25
2. Introducción	29
2.1. El envejecimiento	31
2.1.1. Teorías del envejecimiento	32
2.2. Inflamación y su implicación en el envejecimiento y en las ENDs	34
2.2.1. Las células gliales: actores principales en el proceso neuro-inflamatorio	34
2.2.2. Evidencias de neuro-inflamación en las ENDs	37
2.3. La mitocondria: implicación en el envejecimiento y en las ENDs	38
2.3.1. Alteraciones mitocondriales en el envejecimiento y en las ENDs	40
2.3.2. El control de la calidad mitocondrial como estrategia terapéutica: la biogénesis mitocondrial	41
2.3.3. PGC-1 α : el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial	43
2.4. El estrés oxidativo: consecuencia de la inflamación y el daño mitocondrial	45
2.5. Sinapsis y espinas dendríticas: implicación en las ENDs	46
2.5.1. Espinas dendríticas y función mitocondrial	48
2.6. Los receptores nicotínicos de acetilcolina	49
2.6.1. Los receptores nicotínicos $\alpha 7$: estructura, distribución y funciones	49
2.6.2. Los nAChR $\alpha 7$: activación de rutas de señalización intracelulares y su implicación en la neuroprotección	51
2.6.3. El nAChR $\alpha 7$ como diana terapéutica para el tratamiento de ENDs	52
2.7. El factor de transcripción Nrf2: regulador maestro de la respuesta anti-oxidante	53
2.7.1. Hemo-oxigenasa 1: una enzima implicada en la respuesta anti-inflamatoria, anti-oxidante y en el control de la calidad mitocondrial	55
2.7.2. Activación del eje Nrf2/HO-1 como diana para el tratamiento de ENDs.....	57
3. Hipótesis y objetivos	59
4. Materiales y Métodos	63
4.1. <i>Objetivo 1: Estudio del mecanismo neuroprotector promovido por la activación del $\alpha 7$ nAChR en un modelo in vitro de neurodegeneración basado en el estrés oxidativo</i>	65
4.1.1. Manipulación animal.....	65

4.1.2.	Cultivo organotípico de hipocampo de rata y tratamientos farmacológicos	65
4.1.3.	Cuantificación de la muerte celular mediante ioduro de propidio	66
4.1.4.	Medida del potencial de membrana mitocondrial, la producción de ERO y la producción de radical superóxido	67
4.1.5.	Marcaje de agregados proteicos mediante Tioflavina-S.....	67
4.1.6.	Inmunofluorescencia de Nrf2.....	68
4.1.7.	Análisis de la expresión de proteínas por Western-blot	68
4.1.8.	Análisis estadístico	69
4.2.	<i>Objetivo 2: Evaluación de la implicación del $\alpha 7$ nAChR sobre la biogénesis mitocondrial en células gliales</i>	<i>71</i>
4.2.1.	Cultivo mixto de astrocitos-microglía y tratamientos farmacológicos	71
4.2.2.	Citometría de flujo	71
4.2.3.	Evaluación de la masa mitocondrial mediante Inmunofluorescencia con Mitotracker Green (Mtg).....	72
4.2.4.	Medida de las copias de ADN mitocondrial	72
4.2.5.	Western blot.....	72
4.2.6.	Medida de la Tasa de Consumo de Oxígeno (TCA) en células en cultivo	73
4.2.7.	Ensayo de luciferasa	74
4.2.8.	Vectores adenovirales e infecciones	75
4.2.9.	Tratamientos animales.....	75
4.2.10.	Aislamiento de microglía del cerebro adulto y análisis de la masa mitocondrial	76
4.2.11.	Análisis estadístico	77
4.3.	<i>Objetivo 3: Estudio de las implicaciones fisiológicas y terapéuticas de la activación del $\alpha 7$ nAChR microglial en el control de la inflamación en animales adultos y envejecidos</i>	<i>79</i>
4.3.1.	Tratamientos animales.....	79
4.3.2.	Canulación intracerebroventricular	79
4.3.3.	Inyecciones centrales y periféricas	80
4.3.4.	Test de interacción social	80
4.3.5.	Test de locomoción	80
4.3.6.	Medida de la expresión de citocinas en la microglía del cerebro adulto mediante qPCR.....	81
4.3.7.	Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6	81
4.3.8.	Análisis estadístico	82

4.4.	<i>Objetivo 4: Estudio del efecto de la activación del $\alpha 7$ nAChR a nivel neuronal, centrándonos en su efecto sobre la biogénesis mitocondrial y la formación de espinas dendríticas</i>	83
4.4.1.	Materiales	83
4.4.2.	Cultivos primarios neuronales.....	83
4.4.3.	Transfecciones y tratamientos farmacológicos.....	84
4.4.4.	Tasa de consumo de oxígeno (TCO) e inmunofluorescencia de Mtg.....	84
4.4.5.	Marcaje de espinas dendríticas.....	84
4.4.6.	Análisis de Sholl	85
4.4.7.	Análisis cuantitativo de la morfología de las espinas dendríticas y de la densidad de espinas	85
4.4.8.	Análisis estadístico	85
5.	<i>Resultados</i>	87
5.1.	<i>Objetivo 1</i>	89
5.1.1.	Efecto del tratamiento sub-crónico con LPS y antimicina A, solos o en combinación, sobre la viabilidad de los cultivos organotípicos de hipocampo de rata	90
5.1.2.	Efecto de la combinación LPS/AA sobre la disfunción mitocondrial, el EO y la formación de agregados proteicos	92
5.1.3.	La activación del $\alpha 7$ nAChR induce la enzima HO-1 <i>vía</i> Nrf2 y previene la muerte celular en los cultivos expuestos a LPS/AA	95
5.1.4.	El eje $\alpha 7$ nAChR/HO-1 controla la producción de ERO y la formación de agregados proteicos asociados a la combinación LPS/AA	96
5.2.	<i>Objetivo 2</i>	99
5.2.1.	La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial en células gliales sin aumentar el estrés oxidativo.....	100
5.2.2.	El PNU282987 incrementa la tasa de consumo de oxígeno en células de glía	102
5.2.3.	El efecto mitocondriogénico del PNU282987 es dependiente de la vía de señalización Nrf2/HO-1	103
5.2.4.	La activación de PGC-1 α , <i>vía</i> Nrf2, es necesaria para el incremento en masa mitocondrial promovida por la activación $\alpha 7$ nAChR	105
5.2.5.	La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial <i>in vivo</i> <i>vía</i> HO-1 y PGC-1 α	107
5.3.	<i>Objetivo 3</i>	111

5.3.1.	La activación del $\alpha 7$ nAChR atenúa las alteraciones comportamentales derivadas del tratamiento con LPS	112
5.3.2.	La activación del $\alpha 7$ nAChR reduce la activación microglial derivada del tratamiento con LPS	113
5.3.3.	La activación central del $\alpha 7$ nAChR 2 h post-LPS revierte las alteraciones comportamentales y la neuro-inflamación	116
5.3.4.	La activación periférica de los $\alpha 7$ nAChR, 2 h post-LPS, no produjo mejoría ni a nivel comportamental ni a nivel de marcadores neuro-inflamatorios	118
5.3.5.	Los efectos anti-neuroinflamatorios centrales del $\alpha 7$ nAChR se pierden durante el envejecimiento	119
5.4.	<i>Objetivo 4</i>	121
5.4.1.	La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal produce un incremento en la masa y respiración mitocondriales	122
5.4.2.	La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal no produce alteraciones en la arborización dendrítica pero incrementa el tamaño y densidad de las espinas dendríticas	123
6.	<i>Discusión</i>	125
7.	<i>Conclusiones/Conclusions</i>	145
8.	<i>Bibliografía</i>	151

1. Justificación

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto Teófilo Hernando (ITH) para la I + D del Medicamento, siguiendo una de las principales líneas de investigación de dicho Instituto: la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos neuroprotectores dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Más concretamente, esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del receptor nicotínico alfa 7 en relación a los mecanismos celulares subyacentes a su activación y, su papel en la neuroprotección.

A pesar de los grandes esfuerzos de la comunidad científica encaminados a encontrar estrategias que puedan frenar la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, a día de hoy carecemos de fármacos eficaces en este campo. Es por ello de vital importancia ahondar tanto en el estudio de los mecanismos patofisiológicos característicos de estas enfermedades como en el conocimiento de los mecanismos celulares derivados de la actuación sobre potenciales dianas terapéuticas. Dentro de este contexto, esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de los acontecimientos celulares que subyacen a la activación del receptor nicotínico alfa 7, una diana ampliamente estudiada para la neuroprotección en modelos pre-clínicos y, más recientemente, en ensayos clínicos.

Los experimentos y resultados que se recogen en esta Tesis han sido realizados, en su mayor parte, en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) bajo la dirección de la Dra. Manuela García López. Adicionalmente, también se recogen resultados obtenidos gracias a dos estancias financiadas por la UAM, la primera en el *Institute for Behavioral Medicine Research* (Ohio State University) bajo la dirección del Dr. Jonathan Godbout y la segunda en la *Feinberg School of Medicine* (Northwestern University) bajo la dirección del Dr. Peter Penzes.

2. Introducción

2.1. El envejecimiento

Durante las últimas décadas se han experimentado importantes avances en el campo de la biomedicina, lo cual, unido al desarrollo socioeconómico, ha repercutido positivamente en el incremento de la esperanza de vida. Este aumento en la esperanza de vida, junto a la persistente disminución de las tasas de fecundidad, ha traído como consecuencia un progresivo envejecimiento de la población. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recogen cómo actualmente se está produciendo un cambio demográfico, traducido en un creciente porcentaje de personas por encima de los 60 años. De hecho, la OMS calcula que entre el año 2015 y el 2050, la población mundial por encima de 60 años pasará de 900 a 2.000 millones (OMS, 2015).

En el caso de España, cabe destacar que el crecimiento demográfico está siendo más rápido que en el resto de países europeos; el Instituto Nacional de Estadística prevé que en el año 2050 se alcancen los 16 millones de personas mayores de 64 años, lo cual supondría un 30 % de la población española total (Abades and Rayón, 2012, Instituto Nacional de estadística 2010). Estos cambios demográficos reflejan importantes repercusiones sociales, políticas y sanitarias para los gobiernos de los países industrializados, que tendrán que dar respuesta en los próximos años a la mayor demanda de atención prevista.

Una importante consecuencia del aumento de la población mayor es el consecuente incremento en la prevalencia de las enfermedades asociadas a la edad, tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (ENDs). Centrándonos en estas últimas, conviene destacar que, aunque la etiopatogenia de las diferentes ENDs todavía no haya sido esclarecida, existe un consenso general dentro de la comunidad científica sobre la implicación de mecanismos patológicos comunes. Entre estos eventos patológicos comunes al envejecimiento y a las ENDs se encuentran la inflamación, el estrés oxidativo, el daño mitocondrial, la pérdida de conectividad sináptica o los fallos en el plegamiento proteico. Este paralelismo entre el envejecimiento y las ENDs nos ha hecho plantearnos una estrategia de actuación transversal sobre estos eventos genéricos subyacentes, en lugar de centrarnos en la patofisiología específica de una determinada enfermedad neurodegenerativa.

A lo largo de los siguientes apartados se repasarán algunas de las teorías científicas propuestas para describir y comprender el proceso de envejecimiento y se ahondará en los principales mecanismos patológicos comunes al envejecimiento y a las ENDs.

2.1.1. Teorías del envejecimiento

A nivel fisiológico, el envejecimiento se define como un deterioro general y progresivo de las funciones del organismo que conducen, en última instancia, a una menor capacidad para reaccionar a los cambios fisiopatológicos así como para preservar la homeostasis (Gimenez-Llort et al., 2012). Entre los cambios asociados al envejecimiento destacan las alteraciones a nivel de sistema nervioso central (SNC) como el declive en la capacidad motora y cognitiva, la pérdida de memoria y las alteraciones en la sensibilidad (Farooqui and Farooqui, 2009). Se trata, pues, de un proceso complejo e inexorable que aumenta la susceptibilidad y vulnerabilidad al desarrollo de ENDs. Existen numerosas teorías formuladas para intentar comprender y explicar las razones que conducen a dicho deterioro fisiológico. A continuación repasaremos las más relevantes.

2.1.1.1. La Teoría de los radicales libres

En el año 1956 el Dr. Harman propuso su “*Teoría de los radicales libres*” como causa del envejecimiento (Harman, 1956), la cual depuró en el año 1972 (Harman, 1972). Harman propuso por primera vez que el proceso de envejecimiento podría estar causado por el acúmulo de radicales libres (moléculas con electrones desapareados), que generarían una situación conocida como estrés oxidativo (EO). Dicha acumulación de radicales libres provocaría daños en componentes celulares como oxidación de ácidos nucleicos, peroxidación lipídica, nitración y aumento de carbonilos reactivos. La mitocondria juega un papel central en la teoría de Harman, no sólo como principal fuente celular de radicales libres (como se tratará en apartados posteriores) sino, adicionalmente, como principal víctima de los daños provocados por dichos radicales (Harman, 1972). De hecho, se ha descrito que el ADN mitocondrial (ADNmit) es especialmente vulnerable a este daño oxidativo tanto por la proximidad a estos radicales (generados en la mitocondria) como por la ausencia de histonas protectoras (Poulose and Raju, 2014). El acúmulo de daño a nivel de ADNmit produce fallos en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones

(CTE) y favorece la producción de más EO, generándose así un ciclo de retro-alimentación positiva (Bratic and Larsson, 2013; Harman, 1972).

A día de hoy, numerosos estudios han demostrado una relación inversa entre la cantidad de radicales libres y la longevidad (Barja, 1998), así como una relación directa entre el acúmulo de especies reactivas y el desarrollo de ENDs. Sin embargo, esta teoría se cuestiona debido a la falta de efectividad de las terapias antioxidantes para el tratamiento de estas patologías y plantea nuevos retos asociados, no simplemente a eliminar los radicales libres, sino a inducir la propia maquinaria antioxidante celular.

2.1.1.2. La teoría de la inflamación en el envejecimiento: “Inflamm-aging”

Por otro lado, también existen datos que demuestran que el envejecimiento sería el resultado de un estrés crónico que incide especialmente sobre el sistema inmune. Esta hipótesis sugiere la existencia de una relación directa entre la edad y la activación de los macrófagos, que serían responsables de un estado sub-clínico de inflamación crónica durante el envejecimiento (Franceschi et al., 2000a; Franceschi et al., 2000b; Franceschi et al., 1999). De hecho, se ha llegado a considerar la inflamación como uno de los factores predictores más fiables del envejecimiento (Hardeland et al., 2015). Esta teoría introduce el término de *inmunosenescencia*, según la cual se verían afectados no sólo los macrófagos sino todas las células del sistema inmune, destacando las alteraciones en linfocitos: expansión de las células de memoria, disminución e incluso desaparición de células *naive* o disminución del repertorio de células T (Franceschi et al., 1999). La microglía (célula inmune del SNC) también se encuentra alterada durante el envejecimiento, mostrando un fenotipo pro-inflamatorio crónico y un funcionamiento aberrante de sus sistemas de regulación (Norden and Godbout, 2013), cuestión que se profundizará en el apartado 2.2.1.

De manera paralela a lo que ocurría con el EO, esta teoría también se ha visto apoyada con lo observado durante el desarrollo de las ENDs, todas ellas caracterizadas por incrementados niveles de marcadores inflamatorios. A pesar de los prometedores resultados en modelos animales, los ensayos clínicos con terapias anti-inflamatorias, destinadas eminentemente a intentar bloquear la respuesta pro-inflamatoria, también han tenido resultados negativos en el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Miguel-Alvarez et al., 2015) y controvertidos en el caso de la enfermedad de Parkinson (EP) (Bassani et al.,

2015). Por todo esto, se está barajando la posibilidad de dirigir terapias específicamente a la microglía con el objetivo de inmuno-modular su actividad, más allá de simplemente bloquear la neurotoxicidad inflamatoria; fomentando así las propiedades intrínsecas neuroprotectoras de la microglía y la neuroreparación (Pena-Altamira et al., 2015).

2.1.1.3. “Oxi-inflamm-aging”: convergencia entre el estrés oxidativo y la inflamación en el envejecimiento

Esta teoría se basa en que tanto inflamación como EO serían procesos inter-dependientes. De esta manera, una situación inflamatoria promovería la generación de EO y viceversa, el EO activaría al sistema inmune produciendo una inflamación exacerbada. Es por ello, que ninguno de los dos procesos debería tratarse de manera independiente ni las teorías del envejecimiento deberían ir ligadas a un único proceso, sino derivar de la convergencia de ambos.

2.2. Inflamación: su implicación en el envejecimiento y en las ENDs

La inflamación es un proceso fisiológico caracterizado por un conjunto de reacciones generadas por el organismo que, de manera general, acontece en respuesta a una agresión. Tradicionalmente, se ha considerado el SNC como “inmunológicamente privilegiado” gracias a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) y de su propio sistema inmune; lo cual es clave para limitar el daño de la inflamación en un órgano con baja capacidad de regeneración (Galea et al., 2007). Más allá de la presencia de macrófagos y células dendríticas en ciertas regiones cerebrales (meninges y plexo coroideo), el principal componente inmune del cerebro son las células de microglía (Dantzer et al., 2008). Se trata de macrófagos localizados en el parénquima cerebral y que, al igual que estos últimos, pueden responder de manera similar a estímulos inflamatorios liberando citocinas y prostaglandinas.

2.2.1. Las células gliales: actores principales en el proceso neuro-inflamatorio

El término *glía* engloba a las células no neuronales del SNC: microglía, astrocitos y oligodendrocitos; en esta Tesis nos centraremos en las dos primeras. Las células de la microglía conforman el principal componente del sistema inmune en el SNC. Estas células,

al igual que los macrófagos, derivan del saco vitelino primitivo donde se forman las células del linaje mieloide que migran al SNC durante el desarrollo embrionario y que, una vez que se forma la BHE, quedan “aisladas” del resto del cuerpo. En humanos constituyen un 16 % del contenido cerebral y se encuentran presentes especialmente en la sustancia blanca. Sin embargo, en los roedores, constituyen entre el 5 y el 12 % y su localización es más abundante en la sustancia nigra (Norden and Godbout, 2013).

En estado basal, la microglía presenta un aspecto ramificado con numerosos procesos con capacidad de movimiento, de modo que se encuentra continuamente inspeccionando el microambiente cerebral. De esta manera, la microglía puede responder rápidamente a cambios o alteraciones que se produzcan en la homeostasia cerebral. Las principales funciones que cumpliría la microglía en situación basal serían la eliminación de restos celulares (Harry, 2013), la monitorización de sinapsis (Wake et al., 2009) y la llamada “poda sináptica” (del inglés *synaptic-pruning*) (Paolicelli et al., 2011), que consistiría en la eliminación de sinapsis no funcionales durante el desarrollo cerebral.

Sin embargo, ante cualquier alteración, ya sea generada en la periferia como directamente en el microambiente cerebral, la microglía se activa, adquiriendo un fenotipo redondeado de apariencia ameboidea también denominado fenotipo M1. Bajo este fenotipo activado, la microglía libera citocinas pro-inflamatorias como son las interleucinas IL-1 β o IL-6, o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas, a su vez, promueven la liberación de mediadores pro-inflamatorios secundarios, como las prostaglandinas o el óxido nítrico. Esta activación microglial, en condiciones normales es transitoria, de modo que es capaz de pasar a un fenotipo M2 o anti-inflamatorio consiguiendo, de esta manera, que el estímulo inmunológico sea resuelto.

Estudios recientes indican que los astrocitos son claves tanto para la propagación como para la regulación de la neuro-inflamación (Norden et al., 2016). El astrocito es la célula más abundante a nivel de SNC (cerca del 40 % en el cerebro humano), su origen es neuro-ectodérmico (al igual que las neuronas) y cumplen funciones diversas más allá de la regulación de las respuestas inmunes como: (i) soporte metabólico a las neuronas (almacenan glucógeno y exportan lactato), (ii) re-captación de neurotransmisores (como el glutamato), (iii) producción de factores neurotróficos, (iv) homeostasia iónica, (v)

mantenimiento de la BHE, y (vi) formación de la cicatriz glial y reparación tisular (Farina et al., 2007). Al igual que ocurría con la microglía, los astrocitos se activan por mediadores inflamatorios, tanto a través de receptores TLRs como a través de citocinas (Norden et al., 2014). Una vez que los astrocitos se han activado, producen numerosos factores reguladores que controlan el sistema inmune a nivel central y que tienen un efecto de regulación negativa sobre la microglía, promoviendo un fenotipo anti-inflamatorio. En este sentido, se han realizado diversos experimentos con medios condicionados demostrando, por ejemplo, que los astrocitos liberan el factor TGF- β (factor de crecimiento transformante β), el cual tiene un efecto anti-inflamatorio sobre la microglía (Norden et al., 2014) y que promueve la inducción microglial de la enzima anti-oxidante y anti-inflamatoria hemo-oxigenasa-1 (Min et al., 2006).

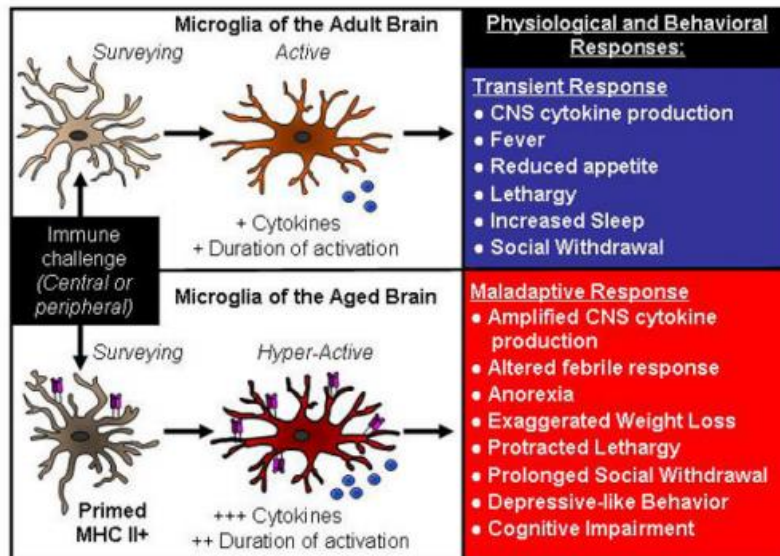


Figura 1. Durante el envejecimiento la microglía adquiere un fenotipo “reactivo o primado” con consecuencias fisiopatológicas y comportamentales. Imagen obtenida de (Norden and Godbout, 2013).

Durante el envejecimiento se produce un incremento del estatus inflamatorio cerebral y este proceso que acontece con la edad se asocia al fenotipo “primado” (del inglés *primed*) de la microglía (**Figura 1**). Este fenotipo primado se caracteriza por una elevada expresión de marcadores de tipo pro-inflamatorio como son el receptor del complemento 3 (CD11b), los rectores tipo Toll (TLRs), la molécula co-estimuladora CD86 o el receptor CD68. Tiene también gran relevancia en este fenotipo primado el complejo mayor de

histocompatibilidad II (MHC II) que se ha encontrado elevado en cerebros tanto de humanos como en roedores, perros y primates no humanos durante el envejecimiento. Mientras que únicamente el 2 % de la microglía adulta de ratón es MHC II⁺, en el envejecimiento el porcentaje se incrementa hasta un 25 %, considerándose, por lo tanto, uno de los marcadores más relevantes de este fenotipo. La consecuencia de este fenotipo asociado a la edad es una respuesta microglial amplificada, lo cual provoca efectos nocivos en las neuronas y contribuye a la patofisiología de las ENDs.

La causa de esta respuesta amplificada se asocia a alteraciones en determinados sistemas de regulación, donde juegan un papel clave los astrocitos. Por ejemplo, ante una situación de inflamación se produce IL-10, citocina anti-inflamatoria que actúa sobre el IL-10R astrocitario promoviendo la liberación de TGF- β lo cual redirige a la microglía hacia un fenotipo M2 (Norden et al., 2014). En el envejecimiento, los niveles de IL-10R están reducidos, de modo que ante un estímulo inflamatorio los astrocitos no responden liberando TGF- β (Norden et al., 2016) lo que favorece la situación de inflamación exacerbada asociada al envejecimiento. Otra citocina anti-inflamatoria que regula el fenotipo microglial es IL-4; sin embargo, la microglía envejecida no responde a dicha citocina (Fenn et al., 2012) así como sus niveles se han encontrado disminuidos en el cerebro envejecido lo cual se asocia con la consecuente mayor neuro-inflamación (Norden and Godbout, 2013).

Finalmente, cabe citar que la microglía no está solo regulada por citocinas sino también por proteínas liberadas por las propias neuronas como son la fractalquina, la glicoproteína de membrana CD200 o TREM2 (del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells* 2); todos ellos importantes para la supervivencia neuronal y cuyas alteraciones también están implicadas en la neuro-inflamación asociada al envejecimiento (Norden and Godbout, 2013).

2.2.2. Evidencias de neuro-inflamación en las ENDs

Como se ha citado previamente, existen numerosas evidencias tanto a nivel clínico como en animales de experimentación que demuestran cómo el estatus inflamatorio se incrementa a lo largo de la edad, postulándose, por lo tanto, que la inflamación podría ser decisiva para el desarrollo de enfermedades tales como el Alzheimer o el Parkinson. El análisis de cerebros post-mortem de pacientes con EA ha revelado que alrededor de las placas de β -

amiloide se localizan tanto microglía reactiva (McGeer et al., 1987) como astrocitos activados (Verkhatsky et al., 2010). De esta manera, la neuro-inflamación sería una característica temprana de la enfermedad que, además, contribuiría a su desarrollo, puesto que los mediadores inflamatorios liberados resultan neurotóxicos. De hecho, se han encontrado elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, etc) en líquido cefalorraquídeo de pacientes (Akiyama et al., 2000). En el caso de EP se ha observado microglía activada en diversas regiones cerebrales, astrogliosis e infiltración linfocitaria (Doty et al., 2015), así como niveles incrementados de numerosas citocinas en líquido cefalorraquídeo y sustancia negra cerebral de pacientes (Doty et al., 2015). De hecho, estudios realizados con Tomografía de Emisión de Positrones (PET) han permitido confirmar la marcada activación microglial de estos pacientes (Gerhard et al., 2006). Gran parte de los estudios se han centrado en el papel de TNF- α puesto que se ha demostrado su implicación en la muerte de neuronas dopaminérgicas característica de esta enfermedad (McGuire et al., 2001). En la actualidad, estudios genéticos parecen demostrar que ciertos polimorfismos en genes asociados a la respuesta inflamatoria podrían ser factores de riesgo para el desarrollo de la EP (como la región HLA o citocinas pro-inflamatorias) (Doty et al., 2015). La inflamación también se asocia a otras ENDs, como el Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica, para revisión completa véase (Frank-Cannon et al., 2009)

Con todo ello, el interés científico en la actualidad se centra en, por un lado, intentar comprender los factores o causas que conducen al incremento de la población de microglía primada, y, por el otro, en la búsqueda de dianas farmacológicas que presenten un efecto inmuno-modulador.

2.3. La mitocondria: implicación en el envejecimiento y en las ENDs

La mitocondria es un orgánulo esencial para la supervivencia de las células eucarióticas ya que supone la principal fuente para la síntesis de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). Además de la síntesis de ATP, la mitocondria también interviene en otros procesos clave tales como la homeostasia del ion calcio, el control del ciclo celular o la muerte celular programada (Szalardy et al., 2015).

La producción de energía en la mitocondria se lleva a cabo entre varios procesos: el complejo piruvato deshidrogenasa, la β -oxidación y el ciclo de Krebs, los cuales ocurren en la matriz mitocondrial; además de la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en la CTE, en la membrana mitocondrial interna. El ciclo de Krebs genera NADH (nicotín adenín dinucleótido en forma reducida) y succinato, sustratos que proveen de electrones a los complejos I y II de la CTE, respectivamente. Los electrones son transportados por la coenzima Q al complejo III, y por el citocromo c hasta llegar al complejo IV, donde son oxidados por el O_2 . Paralelo a este flujo de electrones se genera también un bombeo de protones (H^+) desde la matriz a través de los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembrana, produciéndose de esta manera una diferencia de potencial entre ambos compartimentos que se denominada *fuerza protón-motriz*. El flujo de los protones a la matriz mitocondrial a través del complejo V (H^+ -ATP sintasa) está acoplado a la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa) (**Figura 2**).

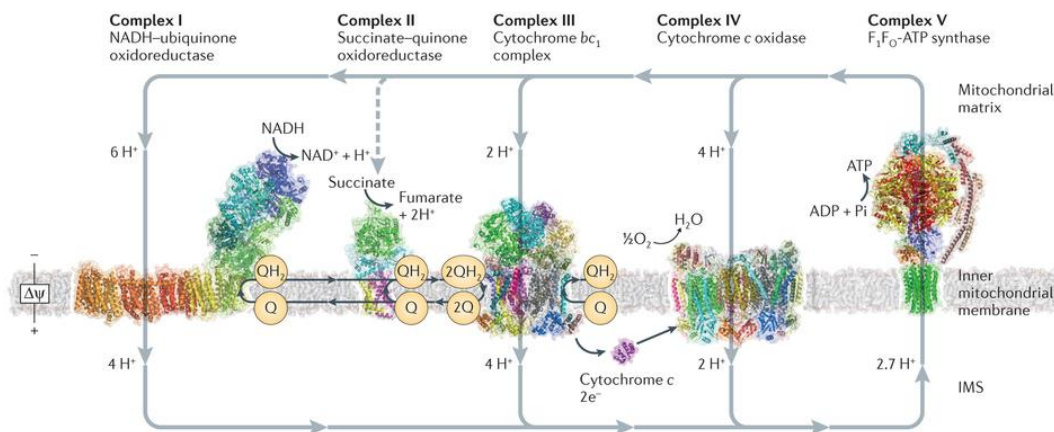


Figura 2. Esquema representativo de la CTE. Imagen obtenida de (Sazanov, 2015)

Este elegante sistema para la producción de energía no es perfecto y una pequeña proporción (de hasta el 2 %) de los electrones que pasan a través de la CTE reaccionan con el oxígeno molecular produciendo anión superóxido (Fukui and Moraes, 2008), el cual a su vez podrá convertirse en otras especies reactivas de oxígeno (ERO) como peróxido de hidrógeno o radical hidroxilo (Balaban et al., 2005). Las ERO, a su vez, pueden reaccionar con el óxido nítrico generando especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Brown and Borutaite, 2001). Para hacer frente a este estrés oxidativo las células cuentan con sistemas

endógenos antioxidantes, como son la superóxido dismutasa (SOD), el ciclo redox del glutatión o la enzima catalasa.

Es importante citar que a día de hoy se sabe que las ERO, especialmente el peróxido de hidrógeno, actúan como moléculas de señalización desarrollando funciones fisiológicas (Balaban et al., 2005; Giorgio et al., 2007; Sena and Chandel, 2012). Sin embargo, cuando la producción de ERO es excesiva y supera la capacidad antioxidante de la célula, se genera una situación deletérea caracterizada por el daño de macromoléculas celulares, incluidos lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual contribuye al desarrollo de numerosas patologías, incluyendo las neurodegenerativas.

2.3.1. Alteraciones mitocondriales en el envejecimiento y en las ENDs

Las patologías neurodegenerativas asociadas al envejecimiento comparten una serie de alteraciones mitocondriales comunes tales como una desestructuración mitocondrial, disminución en la función de la CTE y la fosforilación oxidativa, acumulación de mutaciones en el ADNmit y el incremento en la producción de ERO. A lo largo de este apartado se repasarán algunas de las alteraciones mitocondriales observadas en las ENDs más comunes (EA, EP), para mayor profundización consultar (Scatena et al., 2012).

En el caso de la EA se ha observado que los pacientes presentan un menor número de mitocondrias cerebrales (de la Monte et al., 2000), una menor actividad de complejos mitocondriales como el complejo IV (citocromo c oxidasa), o los complejos piruvato-deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa (Swerdlow and Kish, 2002). Los estudios realizados por PET han demostrado que la tasa de consumo de glucosa de los cerebros con EA es significativamente inferior a la de los controles sanos (Mosconi, 2005). Todo ello llevó a postular la *hipótesis de la cascada mitocondrial en la EA* (Swerdlow et al., 2010), según la cual el origen de la patología sería mitocondrial y explicaría la producción y deposición del péptido β -amiloide (Swerdlow and Khan, 2004).

La evidencia de la implicación mitocondrial en la EP se hizo patente a partir del año 1980, cuando se detectaron un gran número de casos de parkinsonismo en consumidores de drogas de abuso (MPTP: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina). El metabolito activo del MPTP es el MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridínio) que se transporta al interior celular a través

del transportador de dopamina (lo que explica la mayor vulnerabilidad en neuronas dopaminérgicas) e inhibe el complejo I de la CTE (Nicklas et al., 1985; Poirier and Barbeau, 1985). Las consecuencias patológicas derivadas son un aumento del EO, una disminución de la síntesis de ATP y un aumento en los niveles de calcio intracelulares y excitotoxicidad. Más allá de la acción del MPP⁺, la disminución en la actividad del complejo I también se ha reportado en la sustancia nigra de pacientes con EP idiopático (Mann et al., 1992) así como en plaquetas, músculo esquelético, linfocitos y fibroblastos (Swerdlow, 2012). La construcción de cíbridos con mitocondrias de pacientes con Parkinson revela alteraciones similares a las mencionadas con anterioridad junto con una alteración en el metabolismo aeróbico, así como producción de cuerpos de Lewy sin la necesidad de adicionar ningún estímulo externo (Swerdlow, 2012). Mediante ³¹P-ERM (espectroscopía de resonancia magnética) se ha observado una disminución de los niveles de fosfatos altamente energéticos en cerebros con EP, indicando una alteración energética (Hattingen et al., 2009).

Como se ha expuesto, a día de hoy contamos con abundante literatura de las numerosas alteraciones mitocondriales reportadas en las diferentes ENDs, lo cual implicaría a la mitocondria como una importante diana hacia la que dirigir terapias neuroprotectoras.

2.3.2. El control de la calidad mitocondrial como estrategia terapéutica: la biogénesis mitocondrial

El *control de la calidad mitocondrial* es un término que hace referencia a la capacidad de la célula para llevar a cabo los procesos propios del mantenimiento de sus mitocondrias, lo cual implica tanto procesos intra-mitocondriales (reciclaje del grupo hemo, proteínas, etc) como procesos que implican a la mitocondria en su conjunto (tales como la fusión, la fisión, la mitofagia y la biogénesis mitocondrial). Este control de la calidad mitocondrial es clave no sólo en el caso de las enfermedades genéticas mitocondriales, sino en todas las patologías en las que la mitocondria esté implicada de manera secundaria, como son las ENDs, las enfermedades cardiovasculares, la inflamación o el síndrome metabólico (Suliman and Piantadosi, 2016). Con todo ello, la biología de la mitocondria supone, a día de hoy, un campo poco explorado pero potencialmente útil para el desarrollo de estrategias terapéuticas. En esta Tesis nos centraremos en el control de la biogénesis mitocondrial.

La biogénesis mitocondrial es un mecanismo esencial por el cual las células controlan el número de mitocondrias y, de esta manera, van a poder responder a cambios fisiológicos, metabólicos y patológicos. Las mitocondrias son orgánulos especiales, ya que cuentan con su propio material genético y la maquinaria para la expresión del ADNmit. En base a estas observaciones, en el año 1967 el Dr. Margulis propuso el origen extracelular de estos orgánulos. Se propuso que las mitocondrias derivarían de bacterias no sulfuradas púrpura (*Rhodospirillum rubrum*) por un mecanismo de endosimbiosis con un hospedador eucariota ancestral (esta teoría se ha confirmado con análisis filogenéticos que revelan una relación muy cercana). El ADNmit es circular, de doble hélice y con una longitud de 16'5 kb que codifica para 13 subunidades de los complejos de la CTE, 22 ARN de transferencia y 2 ARN ribosómicos. Con ello, la mitocondria expresa parte de los genes necesarios para su propio funcionamiento. Es importante resaltar que la generación de nuevas mitocondrias no es un proceso *de novo* sino que se generan por replicación y división de mitocondrias ya existentes a través de un mecanismo bi-genómico que implica la expresión de alrededor de 1.000 genes nucleares, el traslado de proteínas codificadas en el núcleo hasta la mitocondria, la replicación del ADNmit, el ensamblaje de complejos entre proteínas mitocondriales y nucleares, así como la síntesis de lípidos de membrana (Dominy and Puigserver, 2013).

A nivel molecular, el control de la biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que se regula bajo numerosas situaciones (EO, disponibilidad de nutrientes, ejercicio, hormonas, factores de crecimiento, cambios de temperatura, etc.) y, existen numerosos factores involucrados en su regulación como son los ERRs (del inglés, *estrogen related receptors*) que promueven la generación de mitocondrias en respuesta a señales hormonales, los PPARs (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptors*), susceptibles de modulación farmacológica o los NRF-1 y NRF-2 (del inglés, *nuclear respiratory factor 1, 2*) (Corona and Duchon, 2015). Entre todos ellos destaca el papel central regulador de PGC-1 α .

2.3.3. PGC-1 α : el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial

PGC-1 α (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 alpha*) actúa regulando numerosos factores de transcripción y, en última instancia, coordina e integra la formación de nuevas mitocondrias y el metabolismo energético. PGC-1 α es un co-activador transcripcional que traduce estímulos fisiológicos en programas metabólicos asociados a una mayor actividad mitocondrial, entre los que destaca la activación de la termogénesis en tejido adiposo marrón (Puigserver et al., 1998), la β -oxidación de los ácidos grasos y la gluconeogénesis (Puigserver et al., 2003).

En relación con la biogénesis mitocondrial, PGC-1 α activa la transcripción de NRF-1 y actúa conjuntamente con él, promoviendo la expresión de numerosos genes necesarios para la generación de nuevas mitocondrias. Entre ellos destaca TFAM (del inglés, *Mitochondrial Transcription Factor A*), que se transloca a la mitocondria y regula la transcripción y replicación del ADN mitocondrial (Dominy and Puigserver, 2013) (**Figura 3**); también controla la expresión de algunas subunidades de los complejos de la CTE, genes necesarios para la síntesis de la maquinaria encargada del importe de proteínas a la mitocondria, enzimas para la síntesis del grupo hemo y proteínas ribosomales mitocondriales (Scarpulla, 2008).

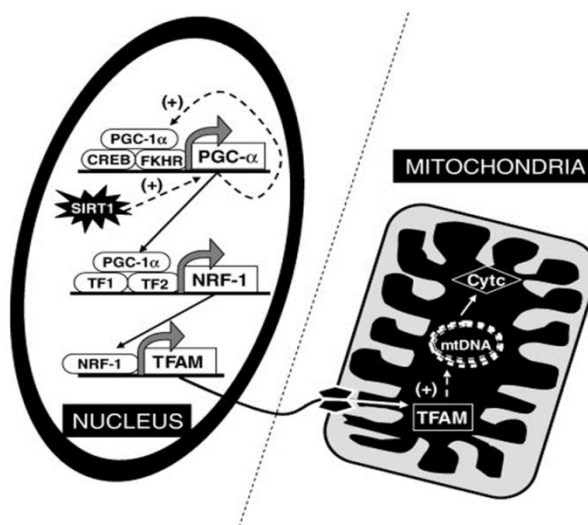


Figura 3. Regulación de la biogénesis mitocondrial a través del eje PGC-1 α /NRF-1/TFAM. Imagen obtenida de (Vina et al., 2009).

De esta manera, PGC-1 α promueve la biogénesis mitocondrial e incrementa el metabolismo energético en respuesta a diferentes condiciones. Si la cantidad de radicales libres fuese proporcional al incremento de la actividad de la CTE en respuesta a PGC-1 α , los activadores de este factor promoverían una situación de EO que podría resultar deletérea. Sin embargo, se ha demostrado que paralelamente a la biogénesis mitocondrial, PGC-1 α activa la expresión de enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa, la catalasa o la SOD1 (St-Pierre et al., 2006). De esta manera, PGC-1 α juega un papel dual: estimula la CTE al tiempo que suprime los niveles de ERO asociados a la actividad mitocondrial, consiguiendo así mantener un balance entre los requerimientos metabólicos y la protección frente a la toxicidad derivada de la acumulación de EO.

El cerebro es un órgano con unos requerimientos energéticos muy elevados, de ahí que PGC-1 α juegue un papel muy importante para la correcta función cerebral. Los animales PGC-1 α ^{-/-} se caracterizan por tener alteraciones a nivel de comportamiento (como hiperactividad) y neuropatología (lesiones espongiiformes principalmente a nivel de estriado a partir de los 3 meses de edad, gliosis, neuronas vacuolizadas, disminución en el número de axones, disminución en el número de mitocondrias, etc) (Lin et al., 2004); de modo que la ausencia de este factor contribuye a la neurodegeneración. Asimismo, se han evidenciado alteraciones en PGC-1 α en diferentes ENDs así como una relación directa entre PGC-1 α y algunas de las características patológicas de estas enfermedades (Chaturvedi and Flint Beal, 2013). Por ejemplo, se ha visto que proteínas asociadas a la EA (como son el precursor de la proteína β -amiloide y la propia proteína β -amiloide) reducen la expresión de PGC-1 α , lo que hace que tanto en modelos animales de experimentación como en pacientes se hayan encontrado niveles reducidos de este factor así como de otros dependientes de PGC-1 α (NRF-1, NRF-2 o TFAM). Por otro lado, la activación de PGC-1 α promueve el procesamiento no-amiloidogénico del precursor del péptido β -amiloide. En la EP, se ha visto que PARIS (del inglés, *Parkin interacting substrate*) se une al promotor de PGC-1 α reprimiendo su expresión y la de NRF-1, llevando a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas. El empleo de activadores de PGC-1 α (ya sea vía Sirtuina-1, AMPK, activadores de PPAR γ , etc) han reportado efectos beneficiosos en modelos animales de estas patologías (Chaturvedi and Flint Beal, 2013); de modo que PGC-1 α se está

postulando como una diana con potenciales efectos positivos para el tratamiento de las ENDs.

2.4. El estrés oxidativo: consecuencia de la inflamación y el daño mitocondrial

La homeostasia redox se mantiene como un equilibrio entre los niveles de moléculas pro-oxidantes y anti-oxidantes; sin embargo, cuando el equilibrio se rompe hacia el acúmulo de pro-oxidantes se genera una situación de EO la cual se asocia a situaciones patológicas tales como las ENDs. Existen numerosas fuentes de EO durante la neurodegeneración entre las que destacan la inflamación y el daño mitocondrial que, aunque tradicionalmente se hayan estudiado como eventos independientes, cada vez existen más evidencias de que estos dos procesos se encuentran interrelacionados y que ambos convergen generando una situación última de EO. En este sentido, es reseñable el hecho de que el cerebro es un órgano especialmente vulnerable al daño oxidativo debido a su alta tasa metabólica, la alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que presenta y su menor cantidad de maquinaria anti-oxidante (Markesbery, 1997). Entre las consecuencias pro-oxidantes de un episodio inflamatorio cabe destacar la activación de enzimas que producen radicales libres tales como la mieloperoxidasa o la NADPH oxidasa (Vernon and Tang, 2013) y la disminución de las defensas anti-oxidantes celulares. En relación a las ENDs, la disfunción mitocondrial asociada (deficiencias en distintas enzimas implicadas en el metabolismo energético, entre otras) conduce a que la mitocondria durante el envejecimiento/neurodegeneración sea menos eficiente produciendo ATP y más eficiente produciendo radicales libres. Bajo estas premisas, consideramos importante no limitarnos a estudiar los procesos únicamente de manera independiente sino también la interrelación entre ambos de cara a obtener resultados con un mayor sentido fisiológico.

2.5. Sinapsis y espinas dendríticas: implicación en las ENDs

Las sinapsis son los lugares neuronales donde se produce un contacto célula-célula con el objetivo de transmitir una señal química o eléctrica a nivel cerebral. Dentro de la transmisión sináptica química, las sinapsis se pueden clasificar en sinapsis tipo I (son excitatorias y emplean como neurotransmisor el glutamato) y sinapsis tipo II (son inhibitorias y emplean como neurotransmisor el GABA –del inglés *gamma-amino butyric acid*-).

Las espinas dendríticas son estructuras especializadas que permiten una rápida y compartimentalizada transmisión de las señales neuronales (**Fig. 4**). Estructuralmente, son salientes celulares ricos en actina, se localizan a nivel post-sináptico y son los lugares celulares donde se localizan la gran mayoría de las sinapsis excitatorias (Robinson et al., 2016).

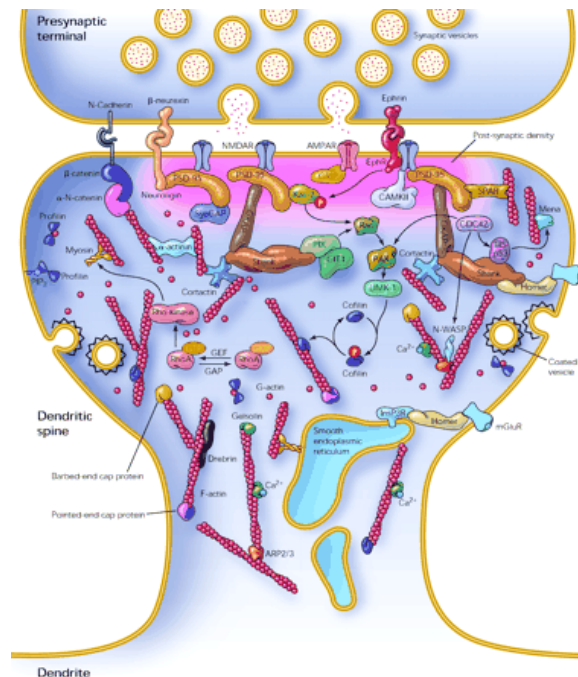


Figura 4. Estructura de las espinas dendríticas. Imagen obtenida de (Calabrese et al., 2006)

Estas estructuras consisten normalmente en un cuello y en una cabeza; y es en la cabeza de la espina, justo debajo de la membrana plasmática, donde se encuentra una región electrónicamente densa que recibe el nombre de PSD (del inglés, *postsynaptic density*). Es en esta región donde se agrupan los receptores AMPA y NMDA (receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico y del N-metil-D-aspartato, respectivamente), las proteínas de anclaje, microtúbulos de actina y moléculas de señalización (Ebrahimi and Okabe, 2014) y su tamaño se correlaciona con el volumen de la cabeza de la espina. Las espinas dendríticas presentan una gran variabilidad tanto en su vida media (desde minutos hasta años) como en su estructura, lo cual se correlaciona con sus propiedades sinápticas. Por ejemplo, espinas grandes establecen conexiones más fuertes y duraderas mientras que, por el contrario, espinas dendríticas pequeñas se correlacionan con conexiones débiles pero de naturaleza más plástica (Woolfrey and Srivastava, 2016).

Como se ha comentado previamente, tanto las sinapsis como las espinas dendríticas son estructuras dinámicas y en cuya plasticidad residen los procesos de memoria y aprendizaje. Es por ello de suma importancia llegar a conocer los mecanismos que gobiernan dicha plasticidad para poder entender y, eventualmente tratar, las enfermedades que cursan con alteraciones en la memoria.

Tanto en el envejecimiento como en muchas ENDs, particularmente en aquellas que cursan con alteraciones cognitivas (EA, EP), se han observado alteraciones a nivel de la morfología y el número de las espinas dendríticas. El estudio de cerebros envejecidos ha demostrado que existe una disminución en la densidad de espinas ya sea en monos (Duan et al., 2003) como en humanos (Jacobs et al., 1997), lo que podría explicar el deterioro cognitivo asociado a la edad. Cabe destacar, además, que la degeneración de las sinapsis y de las espinas dendríticas es un acontecimiento temprano que precede a la posterior muerte neuronal, de ahí la importancia de actuar a este nivel con el objetivo de poder prevenir la neurodegeneración.

En el caso de la EA, estudios estructurales de cerebros *post-mortem* revelaron una disminución en el número de espinas dendríticas en comparación con sus controles de la misma edad tanto en la corteza como en el hipocampo (DeKosky and Scheff, 1990). De hecho, existe una robusta correlación entre el declive cognitivo y la pérdida sináptica (Terry

et al., 1991) y, se ha demostrado que las alteraciones sinápticas podrían preceder a la formación de los agregados proteicos y los ovillos neurofibrilares (Selkoe, 2002). De manera paralela, la pérdida de espinas dendríticas también ha sido ampliamente estudiada en la EP donde se ha demostrado una reducción en su número a nivel nigro-estriatal tanto en modelos animales (ya sea por inyección de 6-hidroxi-dopamina (Ingham et al., 1989), MPTP (Villalba et al., 2009)) como en tejidos *post-mortem* de pacientes con EP (Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005); así como una reducción en el tamaño de las mismas (Villalba and Smith, 2010).

En base a la importancia de la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas en el contexto del envejecimiento y de las patologías del SNC, en la actualidad se está haciendo un gran esfuerzo por buscar estrategias farmacológicas que actúen a dicho nivel. Destacar entre estas estrategias que se encuentran en estudio en la actualidad, la búsqueda de pequeñas moléculas que puedan actuar como activadores de GTPasas de cara a regular la dinámica de formación de los filamentos de actina y tráfico de receptores hacia la zona PSD (Woolfrey and Srivastava, 2016).

2.5.1. Espinas dendríticas y función mitocondrial

Los mecanismos que gobiernan la remodelación de las espinas dendríticas son a día de hoy un campo de gran interés científico. Se han demostrado numerosos mecanismos implicados en este proceso, donde intervendrían, entre otros, la familia de GTPasas Rho y miembros de la súper-familia BAR (del inglés, *Bin/Amphiphysin/Rvs*), siendo en ambos casos proteínas implicadas en la nucleación de filamentos de actina (Ebrahimi and Okabe, 2014). Sin embargo, en lo que a esta Tesis Doctoral respecta, cabe destacar que en los últimos años se está relacionando la función mitocondrial con la formación de sinapsis y espinas dendríticas. A parte del aporte de ATP, hay evidencias que muestran que las mitocondrias jugarían un papel activo en la sinaptogénesis. En el proceso de formación de nuevas sinapsis se produce un movimiento de las mitocondrias a las protrusiones, de hecho, una disminución en el contenido de mitocondrias en las dendritas se correlaciona con una pérdida en el número de espinas dendríticas (Li et al., 2004). Además, el desarrollo y maduración neuronales se correlacionan con un incremento en el número de mitocondrias por célula y la expresión del co-factor transcripcional PGC-1 α es necesario para la

formación de las espinas dendríticas (Cheng et al., 2012). Finalmente, cabe destacar un estudio en el que se analizaron las alteraciones morfológicas mitocondriales asociadas a la EA (menor tamaño mitocondrial, formación de cristales, etc), reveló una relación entre la extensión/localización de las alteraciones mitocondriales con las alteraciones sinápticas, sugiriendo una asociación entre la actividad mitocondrial y el mantenimiento de las espinas (Baloyannis, 2006). Todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia que jugaría la mitocondria para la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas.

2.6. Los receptores nicotínicos de acetilcolina

La cognición es un proceso complejo que implica diversas funciones tales como la memoria, atención, etc; funciones que se encuentran alteradas en las distintas ENDs. El sistema colinérgico está íntimamente asociado con la función cognitiva y, de hecho, se conoce desde hace tiempo que la nicotina tiene la capacidad de mejorar la atención, la memoria y el aprendizaje en diferentes especies como roedores, monos y humanos (Rezvani and Levin, 2001). Asimismo, la mayoría de los tratamientos actuales empleados en clínica para tratar a los enfermos con EA son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, los cuales promueven mayores niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica.

2.6.1. Los receptores nicotínicos $\alpha 7$: estructura, distribución y funciones

Los receptores nicotínicos (nAChRs) son miembros de la super-familia de canales iónicos regulados por ligando. Son glucoproteínas de membrana con un tamaño comprendido entre 270 y 290 kDa, tienen una estructura hetero u homopentamérica derivada de la combinación de subunidades α (2-10), β (2-4), δ , γ (fetal) y ϵ (adulto). Las 5 subunidades se encuentran insertadas en la membrana lipídica y constan a su vez de 4 hélices α transmembrana que conforman en su conjunto un poro catiónico. Se encuentran tanto a nivel periférico como en el SNC, siendo los sub-tipos de nAChRs más predominantes en el cerebro los $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, ambos de interés como dianas farmacológicas para la mejora cognitiva. En esta Tesis nos centraremos en el estudio del sub-tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR).

El $\alpha 7$ nAChR está constituido por 5 subunidades $\alpha 7$ que conforman un poro catiónico permeable a iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (**Figura 5**), y se caracteriza por tener un corto tiempo de

apertura y una rápida desensibilización, lo que se ha interpretado por algunos autores como un mecanismo de protección frente a la sobre-carga de calcio que pudiera ser deletérea.

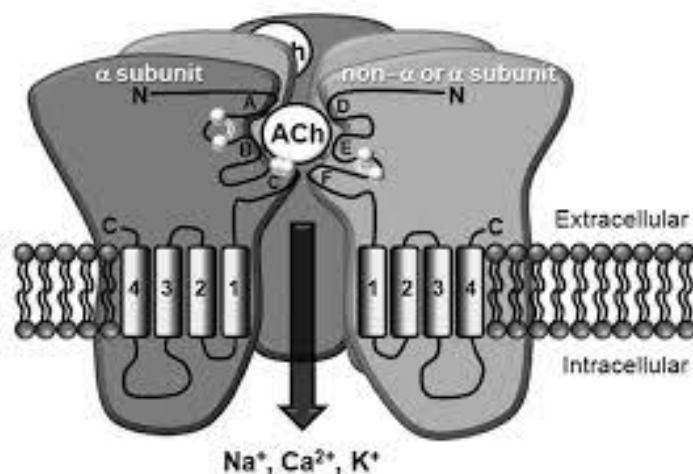


Figura 5. Estructura de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Imagen obtenida de (Jones and Sattelle, 2010)

La localización cerebral del $\alpha 7$ nAChR se ha estudiado a través del empleo de un antagonista selectivo del receptor, la α -bungarotoxina (α -Bgtx) marcada [125 I]- α -Bgtx. Los resultados demuestran que existe una alta expresión tanto en humanos como en otras especies animales en regiones importantes para la cognición como el hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) y la corteza cerebral (Gotti et al., 2006).

A nivel celular, la presencia del receptor $\alpha 7$ en el SNC se ha descrito tanto en neuronas como en microglía, astrocitos, precursores de oligodendrocitos y células endoteliales. En las neuronas, los $\alpha 7$ nAChRs se han detectado en sitios pre-sinápticos, donde facilitan la liberación de neurotransmisores tales como GABA y glutamato, o post-sinápticos donde intervienen en la transmisión sináptica rápida (Gotti and Clementi, 2004). Más allá de sus efectos a nivel de neurotransmisión, los $\alpha 7$ nAChRs neuronales parecen jugar un papel importante en la plasticidad sináptica y la neuroprotección. En células gliales, los niveles del $\alpha 7$ nAChR son inferiores en comparación con los encontrados en neuronas y sus funciones han sido menos estudiadas. En astrocitos, la activación de $\alpha 7$ nAChRs produce incrementos de calcio citosólico, procedente mayoritariamente de reservas intracelulares (Sharma and Vijayaraghavan, 2001); este hecho, unido a la íntima relación de los astrocitos con los procesos neuronales, han llevado a plantear la participación de estos receptores en

la conectividad sináptica (Dineley et al., 2015; Perea and Araque, 2007). Por otro lado, puesto que a nivel periférico se ha demostrado que la subunidad $\alpha 7$ es clave para el control de la inflamación bajo la llamada “*Vía colinérgica anti-inflamatoria*”, se ha postulado que un mecanismo similar podría desarrollarse a nivel de SNC. De hecho, la activación del $\alpha 7$ nAChR con distintos agonistas ejerce una respuesta anti-inflamatoria en cultivo microglial (Shytle et al., 2004). También se ha demostrado, aunque de manera indirecta, que la activación de este receptor *in vivo* promueve efectos anti-inflamatorios en distintos modelos de patología (Parada et al., 2013a; Park et al., 2007; Stuckenholtz et al., 2013). Más allá de su efecto anti-inflamatorio, el $\alpha 7$ nAChR microglial también estaría implicado en la fagocitosis (Takata et al., 2010). En células endoteliales, la expresión del $\alpha 7$ nAChR modula la permeabilidad de la BHE favoreciendo una hiper-permeabilidad (Hawkins et al., 2005); mientras que su presencia en oligodendrocitos parece ser dependiente del desarrollo puesto que únicamente es detectable en sus precursores (Velez-Fort et al., 2009).

2.6.2. Los nAChR $\alpha 7$: activación de rutas de señalización intracelulares y su implicación en la neuroprotección

A pesar de la abundante literatura que demuestra el papel neuroprotector del $\alpha 7$ nAChR frente a diversos estímulos citotóxicos, los mecanismos intracelulares implicados no han sido tan ampliamente estudiados. A pesar de su estructura de canal iónico y su permeabilidad al calcio, se ha demostrado en los últimos años que la protección mediada a través de este receptor parece ser independiente de la entrada de dicho ion (del Barrio et al., 2011a; Del Barrio et al., 2011b). Una de las cinasas activadas a través del $\alpha 7$ nAChR es JAK2 (*jannus cinasa 2*) que fosforila y activa a STAT3 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*). Esta última dimeriza y se transloca al núcleo activando la transcripción génica (Marrero and Bencherif, 2009; Shaw et al., 2002; Villarino et al., 2015). Adicionalmente, se ha descrito que la fosforilación y activación de JAK2 también transduce la activación de la ruta fosfatidil-inositol-3-fosfato cinasa/Akt (PI3K/Akt) (Del Barrio et al., 2011b). De hecho, el empleo de inhibidores específicos tanto de la proteína JAK2 como de Akt revierten la protección mediada por el receptor $\alpha 7$ (Del Barrio et al., 2011b), indicando la importancia de ambas proteínas en el mecanismo neuroprotector. Finalmente, también se ha descrito que la activación de esta ruta de señalización

($\alpha 7$ /JAK2/PI3K/Akt) conduce a la inducción de la enzima anti-oxidante y anti-inflamatoria hemo-oxigenasa I (Parada et al., 2010).

2.6.3. El nAChR $\alpha 7$ como diana terapéutica para el tratamiento de ENDs

El $\alpha 7$ nAChR se ha postulado como una potencial diana farmacológica en base a la detección de alteraciones en dicho receptor en las ENDs. La disfunción colinérgica ha sido ampliamente descrita en la EA la cual se asocia a los déficits cognitivos característicos de esta patología. En cerebros de pacientes con EA se ha detectado una disminución de los niveles de la acetilcolina (ACh) liberada así como una expresión disminuida de los nAChRs (Francis et al., 1999); de hecho, el mecanismo de acción de la mayoría de los tratamientos para la EA se basan en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (donepecilo, rivastigmina y galantamina) que proporcionan una mejoría modesta y transitoria de la sintomatología. El hecho de que la galantamina presente una potencia inhibidora de esta enzima 30 veces inferior que otros anticolinesterásicos llevó al descubrimiento de que podía actuar como modulador alostérico de los nAChRs, favoreciendo la acción de la ACh (Schrattenholz et al., 1996). Asimismo, el hecho de que sus efectos beneficiosos se veían bloqueados por α -Bgtx (antagonista específico de los $\alpha 7$ nAChR), puso de manifiesto la importancia del $\alpha 7$ nAChR en su mecanismo de acción (Arias et al., 2004). Numerosos estudios pre-clínicos demuestran los efectos positivos de la activación de los $\alpha 7$ nAChRs para tratar la EA (Kihara et al., 2001; Medeiros et al., 2014); de hecho, recientemente se han llevado a cabo ensayos clínicos con un agonista parcial del receptor (EVP-6124 o Encenicline) que presentó resultados positivos en las fases I y II, siendo bien tolerado y presentando mejoras cognitivas en comparación con el placebo (Deardorff et al., 2015). Estos resultados favorables han promovido la realización de un ensayo clínico fase III, cuyos resultados aún no se han revelado.

De manera similar, en la EP también se han detectado alteraciones en la expresión y funcionalidad de estos receptores (Burghaus et al., 2003), postulándose también que su activación y/o modulación farmacológica podría suponer una estrategia terapéutica para estos pacientes. Estudios pre-clínicos demuestran resultados positivos en diversos modelos de parkinsonismo, mejorando tanto los síntomas motores como no motores de esta patología (Quik et al., 2015).

Los beneficiosos efectos derivados de la activación del $\alpha 7$ nAChR observados en los distintos tipos celulares, así como sus efectos positivos en estudios *in vivo* asociados a diversas patologías, ponen de manifiesto la importancia de este receptor y la necesidad de seguir estudiando sus funciones fisiológicas y su potencial farmacológico.

En cuanto a los agonistas, cabe citar que interaccionan en el bolsillo hidrofóbico formado por dos subunidades adyacentes. El principal sitio de unión se localiza en el extremo amino terminal, donde se encuentran 4 aminoácidos aromáticos (Tyr 93, Trp 149, Tyr 190 y Tyr 198) altamente conservados (Sine and Engel, 2006). Existen diferentes agonistas $\alpha 7$ (GTS-21, AR-R17779, etc), aunque merece especial mención al N-(3R)-1-Azabibclo[2.2.2]oct-3-il-4-clorobenzamida o PNU282987, puesto que será el agonista $\alpha 7$ nAChR que se empleará a lo largo de este trabajo de investigación. El PNU282987 fue descrito en el año 2005 por Bodnar y colaboradores (Bodnar et al., 2005) en cuyo trabajo demostraron que dentro de una librería de benzamidas, el PNU282987 era el agonista $\alpha 7$ nAChR más potente. Se ha elegido este compuesto debido no sólo a su alta afinidad por este receptor ($K_i=26$ nM) sino también por su alta selectividad por el mismo (dentro de los receptores nicotínicos, a parte del $\alpha 7$, sólo se ha descrito actividad sobre los $\alpha 3\beta 4$, con una $IC_{50} \geq 60$ μ M). Adicionalmente, cabe destacar que este compuesto atraviesa la BHE (Wishka et al., 2006) y que ha demostrado propiedades neuroprotectores en diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (Del Barrio et al., 2011b; Di Cesare Mannelli et al., 2015; Krafft et al., 2012; Parada et al., 2013a; Parada et al., 2010).

2.7. El factor de transcripción Nrf2: regulador maestro de la respuesta anti-oxidante

Nrf2 (del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) es un factor de transcripción clave para la regulación del equilibrio redox de la célula. Pertenece a una familia de factores de transcripción denominados *Cap'n'collar* con una característica cremallera de leucina (bZip) en la región C-terminal. Nrf2 controla la expresión de hasta el 1 % del genoma humano; incluyendo genes implicados en la homeostasia redox, la reparación del ADN, la proteostasis o la bioenergética mitocondrial. Este hecho hace que la actividad de Nrf2 deba estar finamente regulada. En situación basal, Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína Keap1 (del inglés, *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*);

Keap1 se une a al complejo ubiquitín ligasa E3 a través del adaptador Cullin-3, conduciendo de esta manera a la degradación de Nrf2 vía proteasoma. Sin embargo, ante diversas situaciones fisiológicas y patológicas se produce la escisión del complejo Nrf2/Keap-1 y el Nrf2 liberado se transloca al núcleo donde se une a las secuencias ARE (del inglés, *Antioxidant Response Elements*), más recientemente denominadas EpRE (del inglés, *Electrophilic Response Elements*). Entre los mecanismos que regulan la activación de Nrf2 cabe destacar el EO y los agentes electrófilos, ambos actuarían produciendo la oxidación de ciertas cisteínas de Keap-1 (Cys 151, Cys 273, Cys 288) las cuales son necesarias para la ubiquitinación de Nrf2; al oxidarse dichas cisteínas se produce un cambio conformacional que libera a Nrf2 evitándose así su degradación (modelo “llave cerradura”). Adicionalmente, también se ha descrito que la proteína Nrf2 tiene un total de 102 residuos susceptibles de fosforilación (Cuadrado, 2015), algunos de los cuales se han propuesto como dianas para la regulación de la localización de Nrf2. Dentro de este mecanismo de regulación se han descrito diversas cinasas implicadas, algunas activadoras (PI3K/Akt, PKC, Erk) o represoras (GSK-3 β , Fyn) (Buendía et al., 2016; Cuadrado, 2015) de Nrf2 (**Figura 6**); sin embargo, resulta un mecanismo complejo de caracterizar y en la actualidad se está haciendo un gran esfuerzo científico para ahondar en su conocimiento.

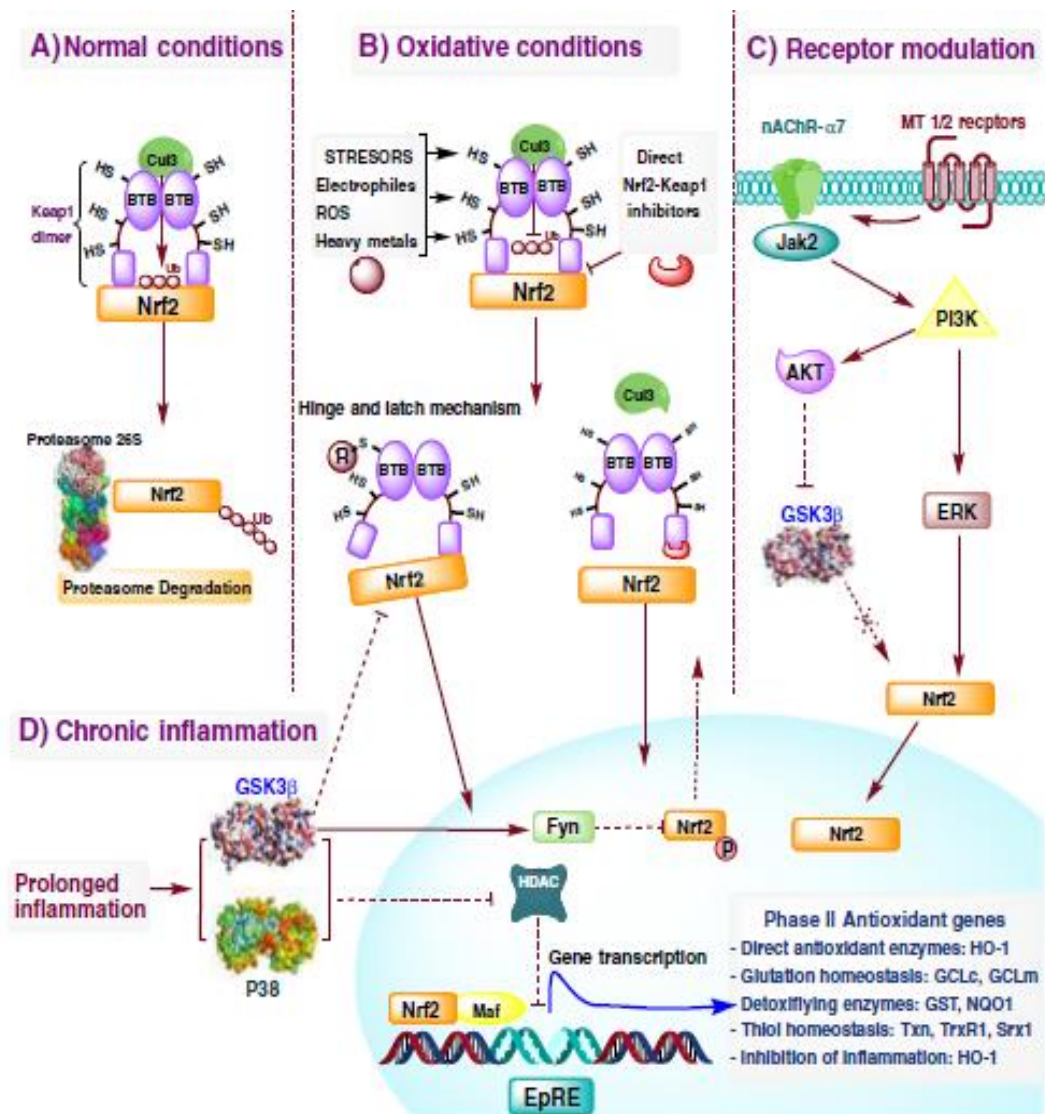


Figura 6. Mecanismos moleculares que conducen a la activación de la vía Nrf2. Imagen obtenida de (Buendia et al., 2016)

2.7.1. Hemo-oxigenasa 1: una enzima implicada en la respuesta anti-inflamatoria, anti-oxidante y en el control de la calidad mitocondrial

El factor de transcripción Nrf2 está implicado en la expresión tanto constitutiva como inducible de genes de respuesta anti-oxidante (EpRE) tales como la SOD1, la glutatión-S-transferasa, las subunidades moduladora y catalítica de la γ glutamil-cisteína ligasa, la NADPH quinona oxido-reductasa 1 (NQO1) y hasta un total de más de 250 genes

implicados en la respuesta anti-oxidante/anti-inflamatoria celular, así como en el metabolismo de xenobióticos (Buendia et al., 2016).

Entre todos los genes que regula Nrf2 cabe destacar, por su implicación en este trabajo, la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1). Estructuralmente, presenta un dominio terminal hidrofóbico que le confiere una compartimentalización a nivel de membranas. Tradicionalmente se consideró que HO-1 se encontraba asociada al retículo endoplásmico aunque más recientemente se ha determinado su presencia en otros compartimentos sub-celulares tales como núcleo, mitocondria o membrana plasmática. La HO-1 es una enzima inducible de 32 kDa que cataliza el paso limitante en la conversión del grupo hemo a biliverdina (producto que es rápidamente transformado en bilirrubina por acción de la biliverdina reductasa) reacción tras la cual se libera monóxido de carbono (CO) y hierro libre. Tanto la HO-1 como los sub-productos derivados de su actividad (CO, bilirrubina, biliverdina) tienen efectos anti-inflamatorios, anti-oxidantes y, en definitiva, protectores frente a numerosos modelos de daño celular (Bach, 2005; Otterbein et al., 2003). De hecho, la importancia de la HO-1 ha sido evidenciada con el desarrollo de animales HO-1^{-/-} en los cuales se ha descrito, por un lado, que desarrollan un estado inflamatorio crónico que progresa con la edad, así como que en modelos de daño celular (isquemia/reperfusión cardíaca, inflamación pulmonar o hipertensión, entre otros), la ausencia de esta enzima exacerba la patología (Soares and Bach, 2009). De forma contraria, la inducción de la expresión de HO-1 o la administración de su sub-producto, CO, resulta cito-protectora (Minamino et al., 2001; Yachie et al., 1999; Yet et al., 2001). De hecho, los efectos del CO son similares a los derivados de HO-1, el CO suprime la respuesta inflamatoria, promueve un fenotipo M2 microglial, tiene efectos inhibidores de la agregación plaquetaria y evita la apoptosis (Otterbein et al., 2003). Por otro lado, también se han descrito efectos beneficiosos para el resto de sub-productos; tanto la bilirrubina como la biliverdina tienen propiedades anti-oxidantes (Stocker et al., 1987) y el Fe²⁺ induce la expresión de ferritina, limitando la generación de radicales libres (Balla et al., 1992). Más allá de los efectos anti-oxidantes y anti-inflamatorios de esta enzima, se ha visto que HO-1/CO participan en el control de la calidad mitocondrial a través de la activación de la biogénesis mitocondrial (Piantadosi et al., 2008; Suliman et al., 2007), proceso que parece estar relacionado con los

efectos anti-inflamatorios de la enzima (Piantadosi et al., 2011; Suliman and Piantadosi, 2014).

2.7.2. Activación del eje Nrf2/HO-1 como diana para el tratamiento de ENDs

El eje Nrf2/HO-1 ha sido ampliamente estudiado en el contexto del envejecimiento/neurodegeneración y han sido descritas numerosas alteraciones de dicho eje en las ENDs, de ahí que se postule como una diana de interés para el tratamiento de las mismas. Durante el envejecimiento, se produce una disminución de la capacidad de Nrf2 para inducir la expresión de enzimas de fase II (Zhang et al., 2015), lo cual contribuye al incremento del EO asociado a la edad; este proceso parece exacerbarse en las ENDs. En modelos animales de la EA, como es el ratón APP/PS-1 (mutaciones en el precursor del β -amiloide y en la presenilina 1), hay una disminución de los niveles de Nrf2 que se ha correlacionado con la deposición de placas de β -amiloide (Kanninen et al., 2008). Además, otra característica patológica de la EA es la sobre-activación de la enzima GSK-3 β (*glucógeno sintasa cinasa 3-beta*), la cual produce una regulación negativa de Nrf2, contribuyendo así a la desregulación de esta vía. Estos datos se han corroborado en muestras de pacientes con EA en las que se ha observado que, a pesar de los incrementados niveles de EO, la localización de Nrf2 es predominantemente citoplasmático (Ramsey et al., 2007). La implicación de Nrf2 para el desarrollo de la EP también ha sido ampliamente establecida. Por ejemplo, los animales Nrf2^{-/-} son más susceptibles al estímulo asociado al parkinsonismo MPTP (Innamorato et al., 2010). Muestras de pacientes con EP demuestran que Nrf2 sí se localiza a nivel nuclear, aunque no parece ser suficiente para contrarrestar el elevado EO asociado a la enfermedad. Paradójicamente, enzimas de fase II, como la HO-1, se han encontrado aumentadas en ENDs como la EA o la EP (Schipper, 2004), probablemente en un esfuerzo para restablecer los niveles oxidativos cerebrales.

En base a las evidencias científicas que demuestran la desregulación de la vía Nrf2/EpRE en las ENDs, en la actualidad se persigue la activación farmacológica de la misma de cara a obtener neuroprotección. Tanto en modelos celulares como animales de EA y EP, la activación de la vía Nrf2/EpRE y la inducción de enzimas de fase II, mediante el empleo de inductores naturales (triterpenoides, polifenoles, flavonoides) o sintéticos, han demostrado efectos beneficiosos (Buendia et al., 2016). Destacar, por ejemplo, el

resveratrol, un polifenol natural obtenido de la uva, que en la actualidad se está estudiando en fase clínica para la EA (NCT00678431, NCT01504854, NCT01716637, NCT01219244), al tiempo que se están realizando modificaciones químicas de esta molécula persiguiendo mejorar su actividad y bio-disponibilidad. Otros inductores de Nrf2 que han reportado efectos positivos en modelos pre-clínicos de EA/EP y que se están estudiando en fase clínica en la actualidad son el dimetilfumarato (aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple), el *2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid methyl ester* (para enfermedad renal crónica), el sulforafano (para autismo) o la melatonina (para numerosas patologías, entre ellas el autismo, la epilepsia o la EA).

3.1 Hipótesis y objetivos

Existe abundante evidencia acerca de los efectos neuroprotectores mediados por el $\alpha 7$ nAChR en distintos modelos de patología; sin embargo, los mecanismos celulares no han sido totalmente esclarecidos. Es por ello que en el presente trabajo de investigación nos proponemos un estudio pormenorizado de los mecanismos moleculares que acontecen tras la activación del $\alpha 7$ nAChR y su implicación en la neuroprotección, estudiando sus efectos en los distintos tipos celulares cerebrales así como sus consecuencias fisiológicas/farmacológicas.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

3.1. Estudio del mecanismo neuroprotector promovido por la activación del $\alpha 7$ nAChR en un modelo *in vitro* de neurodegeneración basado en el estrés oxidativo

Para ello, nos proponemos la generación de un nuevo modelo *in vitro* de neurodegeneración basado en el EO en el cual nos planteamos estudiar el mecanismo neuroprotector del agonista nicotínico $\alpha 7$, PNU282987, así como la implicación de la enzima HO-1.

3.2. Evaluación de la implicación del $\alpha 7$ nAChR sobre la biogénesis mitocondrial en células gliales

Evaluar el efecto del PNU282987 sobre el metabolismo energético y sobre la ruta de biogénesis mitocondrial en células gliales tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudio de la implicación del factor de transcripción Nrf2 y las proteínas HO-1 y PGC-1 α .

3.3. Estudio de las implicaciones fisiológicas y terapéuticas de la activación del $\alpha 7$ nAChR microglial en el control de la inflamación en animales adultos y envejecidos

Con este objetivo queremos evaluar la capacidad anti-inflamatoria del PNU282987 en un modelo de inyección *in vivo* de lipopolisacárido bacteriano (LPS), centrándonos en su efecto a nivel microglial y comparando los resultados en animales adultos y envejecidos.

3.4. Estudio del efecto de la activación del $\alpha 7$ nAChR a nivel neuronal, centrándonos en su efecto sobre la biogénesis mitocondrial y la formación de espinas dendríticas

Para ello, nos proponemos estudiar si la activación del $\alpha 7$ nAChR tiene efectos sobre el metabolismo energético en cultivo primario neuronal, así como su efecto sobre el tamaño y número de espinas dendríticas.

Para una mejor comprensión, a continuación se detallarán las secciones de *Materiales y Métodos* y de *Resultados* organizadas en relación a los Objetivos 1, 2, 3 y 4.

4. Materiales y Métodos

4.1. Objetivo 1: Estudio del mecanismo neuroprotector promovido por la activación del $\alpha 7$ nAChR en un modelo in vitro de neurodegeneración basado en el estrés oxidativo

4.1.1. Manipulación animal

Se emplearon ratas post-natales Sprague-Dawley de 8 días de edad. Toda la manipulación animal se realizó siguiendo la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Todos los protocolos habían sido previamente aprobados por el Comité de Ética de la UAM siguiendo la Guía Europea para el uso y cuidado de animales para investigación de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea del 22 de septiembre del 2010 (2010/63/UE) y con el Real Decreto del 1 de febrero del 2013 (53/2013). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales.

4.1.2. Cultivo organotípico de hipocampo de rata y tratamientos farmacológicos

Para la realización del cultivo, las ratas fueron decapitadas, se extrajeron los cerebros y se diseccionaron los hipocampos en frío. Se realizaron rodajas transversales de 300 μ m empleando un *McIlwain tissue Choper*, se sumergieron en solución salina HBSS (del inglés, *Hank's Balanced Salt Solution*; Invitrogen) suplementada con D-glucosa y se separaron las rodajas empleando una lupa Leica SE6 (Leica, España). Posteriormente, las rodajas fueron cultivadas sobre estructuras semipermeables denominadas Millicell (Millipore CM) que permiten el intercambio de nutrientes con el medio de cultivo (1 ml) en el que está sumergido el Millicell, en placas de 6 pocillos (**Figura 7**). El medio de cultivo empleado fue Neurobasal + 10 % de suero bovino fetal (SBF, Invitrogen) (primeras 24 h) y Neurobasal + B27 (Life Technologies) sin SBF durante el resto de días de estabilización (3/4 días). Transcurrido el tiempo de estabilización, se procedió a realizar los tratamientos con medio Neurobasal + B27 sin anti-oxidantes. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37° C con 5 % de CO₂, cambiando el medio 2 veces/semana.

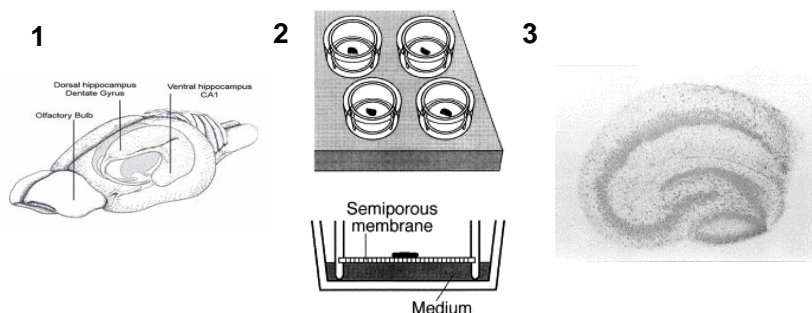


Figura 7. Esquema representativo del proceso de elaboración del cultivo organotípico de hipocampo de rata. Se resumen los pasos para el desarrollo del cultivo: extracción del hipocampo (1), cultivo de las rodajas sobre las membranas semipermeables (2) y la imagen de una rodaja de hipocampo en cultivo (3). Imagen modificada de (Gahwiler et al., 1997).

Cada cultivo correspondió a un animal distinto, empleándose un mínimo de 2 rodajas por condición en cada experimento independiente. Los tratamientos empleados fueron: LPS (lipopolisacárido bacteriano de *E. coli* serotipo 026:B6) y antimicina A (Sigma-Aldrich), con los cuales se realizaron curvas de concentración y distintos tiempos de tratamiento (4 y 7 días). El PNU282987 (Tocris Scientific/Biogen) se empleó a 10 μ M, concentración que se eligió en base a resultados previos del laboratorio en los que se demostraba que dicha concentración era la más efectiva (Del Barrio et al., 2011b; Parada et al., 2013a; Parada et al., 2010), habiendo también sido empleada en otros trabajos de la literatura (Di Cesare Mannelli et al., 2015; Hu et al., 2009). De esta manera, todos los experimentos *in vitro* realizados con el PNU282987, tanto en este objetivo como en los posteriores, se llevarán a cabo a dicha concentración. La α -Bgtx se empleó a 100 nM y la protoporfirina-IX de estaño (SnPP) a 3 μ M, ambos procedentes de *Frontier Scientific Europe* (Lancashire, Gran Bretaña). En la condición Basal se empleó el vehículo adecuado: DMSO (PNU282987, SnPP, antimicina-A) y H₂O: LPS y α -Bgtx.

4.1.3. Cuantificación de la muerte celular mediante ioduro de propidio

Al final del experimento se incubaron las rodajas con 1 μ g/ml de ioduro de propidio (IP) durante al menos 30 minutos. Se midió la fluorescencia en las regiones CA1 y CA3 de cada rodaja con un objetivo de aumento 10X, empleando un microscopio de fluorescencia

invertido NIKON eclipse T2000-U (Izasa). Las longitudes de onda de excitación y emisión son 530 y 580 nm, respectivamente. El análisis de la fluorescencia se llevó a cabo empleando el programa Metamorph versión 7.0. La fluorescencia en condiciones basales se consideró como 100 % de viabilidad y se normalizaron los resultados obtenidos con el resto de variables respecto a este valor.

4.1.4. Medida del potencial de membrana mitocondrial, la producción de ERO y la producción de radical superóxido

Se emplearon las sondas fluorescentes TMRE (del inglés, *Tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate*) para el análisis del potencial de membrana mitocondrial, H₂DCFDA (del inglés, *2',7' - Dichlorodihydrofluorescein diacetate*) para la detección de ERO y DHE (del inglés, *dihydroethidium*) para medir la producción de radical superóxido. Las sondas fueron incubadas (TMRE a 100 nM, H₂DCFDA a 10 µM y DHE 3,2 µM) durante 30 minutos, y posteriormente se midió la fluorescencia en la región CA1 del hipocampo con un objetivo de 10X. Las longitudes de onda de excitación para TMRE, H₂DCFDA y DHE son 549, 495 518 nm respectivamente; y las de emisión 574, 529 y 605 nm, respectivamente. Se normalizaron los resultados frente al número total de células empleando 1 µg/ml de la sonda Hoechst 33342, medida a una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm.

4.1.5. Marcaje de agregados proteicos mediante Tioflavina-S

La Tioflavina-S es un colorante con la capacidad de unirse a estructuras ricas en láminas β produciéndose, consecuentemente, un incremento en la fluorescencia. Para la realización de la tinción con Tioflavina-S se fijaron las rodajas empleando paraformaldehído al 4 % en PB durante 1 h. Las rodajas fijadas se colocaron en portas gelatinizados y se dejaron secar durante toda la noche. Una vez secas, se introdujeron durante 1 hora en solución cloroformo:etanol (1:1 v/v). Posteriormente, se hidrataron mediante pases sucesivos de 10 segundos en etanol absoluto, etanol 96 %, etanol 70 % y 5 minutos en agua destilada. A continuación, se incubaron con Tioflavina-S (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml en etanol al 50 % durante 1 hora. Se mantuvieron 5 minutos en etanol al 80 %, se hicieron tres pases de 5 segundos en agua destilada y tres lavados de 5 minutos en PB,

añadiendo la sonda fluorescente Hoechst 33342 1 µg/ml en el segundo lavado. Finalmente, se procedió al montaje y se tomaron las imágenes en la región CA1.

4.1.6. Inmunofluorescencia de Nrf2

Después de fijar las rodajas con paraformaldehído al 4 %, las rodajas se dejaron secar en portas gelatinizados. Se permeabilizaron empleando una solución de Triton al 0,1 % durante 10 min y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich). El anticuerpo primario (anti-Nrf2, H-300, SC-13032, Santa Cruz, Dallas, TX) se incubó 1:200 en la solución de bloqueo durante toda la noche. Después de 3 lavados con PBS, se incubaron las rodajas con el anticuerpo secundario durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados adicionales con PBS, añadiendo Hoechst (1 µg/ml) en el segundo lavado y se realizó el montaje. Las imágenes se tomaron mediante microscopio confocal (TCS SPE, Leica, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 63X. Las imágenes que se muestran corresponden a la proyección máxima.

4.1.7. Análisis de la expresión de proteínas por Western-blot

Al final del experimento se procedió a la extracción de las proteínas empleando un buffer de lisis hipotónico (1 % Nonidet P-40, 10 % de glicerol, 137 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH=7.5, 1 µg/ml de leupeptina, 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM de NaF, 1 mM de pirofosfato sódico y 1 mM Na₃VO₄). Se añadió una pastilla de inhibidor de proteasas (complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania) por cada 10 ml de buffer.

Las proteínas del lisado se separaron por electroforesis PAGE-SDS a un amperaje constante de 25 mA/gel durante 2 horas y media, y se realizó la electrotransferencia a 70 mA durante 3 horas en frío a una membrana de PVDF (Millipore Iberica SA).

Finalizada la electrotransferencia las membranas fueron bloqueadas con una solución de TTBS + 4 % de BSA, para incubarlas a continuación con anti-HO-1 (1:1000) (Santa Cruz), anti-β-actina (1:100.000) (Sigma-Aldrich) y anti-Nox4 (1:3,5). El anticuerpo frente a Nox4 es un anticuerpo monoclonal desarrollado en conejo que reconoce la región citosólica de la enzima y que nos fue cedido por el grupo del Dr. Pidder Jansen-Duerr. Tras tres lavados de 10 min con TTBS, se incubaron las membranas durante 45 min con los anticuerpos

secundarios correspondientes conjugados con la peroxidasa de rábano (1:10.000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) para detectar las proteínas específicas por quimioluminiscencia. Tras tres lavados de 10 min con TTBS, se revelaron las membranas empleando ECL Advance Western-blotting Detection Kit (GE Healthcare). La densidad óptica se cuantificó empleando el programa Scion Image® Alpha4.0.3.2. Se consideró la situación control como 100 % y se normalizaron el resto de variables respecto a este valor.

4.1.8. Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se representaron como media y error estándar respecto a la media (e.e.m). El análisis empleado fue ANOVA de una vía con corrección de test de Newman-keuls para determinar las diferencias entre grupos, y t-Student pareado para determinar diferencias entre dos variables; considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4.2. Objetivo 2: Evaluación de la implicación del $\alpha 7$ nAChR sobre la biogénesis mitocondrial en células gliales

4.2.1. Cultivo mixto de astrocitos-microglía y tratamientos farmacológicos

Para realizar el cultivo primario mixto de astrocitos y microglía se emplearon ratas Sprague-Dawley de 2-4 días siguiendo todas las premisas descritas en el apartado 4.1.1. para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Los animales fueron sacrificados y se extrajeron las cortezas cerebrales, se retiraron las meninges, y se realizó una disgregación mecánica en la solución salina HBSS. Posteriormente, se sembraron las células en medio Eagle modificado en Dulbecco (DMEM)/F12, con un 20 % de SBF, y suplementado con penicilina 1000 U/ml y estreptomycin a 0.1 mg/ml (Invitrogen, Madrid). Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células por pocillo y se cultivaron a 37 °C con un 5 % de CO₂. El medio fue reemplazado a los 5 días in vitro (DIV) por un DMEM/F12 con SBF al 10 %. Los experimentos se realizaron a los 7-10 DIV.

El mismo protocolo se empleó para realizar cultivos de glía de ratón. Los animales Nrf2^{-/-} y sus controles fueron cedidos por el Dr. Antonio Cuadrado.

A lo largo de este segundo capítulo todos los tratamientos se realizaron en medio DMEM/F12 con un 10 % de SBF durante 48 h. Se emplearon los siguientes compuestos a las siguientes concentraciones: PNU282987 (10 μ M), α -Bgtx (100 nM) y SnPP (3 μ M). La variable Basal fue tratada con el mismo vehículo empleado para disolver el compuesto que se estaba ensayando de forma paralela, es decir, DMSO (PNU282987 y SnPP) o H₂O (α -Bgtx).

4.2.2. Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo se empleó un Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Para ello, tras un lavado con PBS, se recogieron las células y tras su centrifugación (2.400 revoluciones por minuto –r.p.m.- 6 min) se tiñeron en 50 μ l de PBS con la concentración apropiada de sonda fluorescente (Mitotracker Green-FM 100 nM, H₂DCFDA 5 μ M, TMRE 100 nM, CD45-FITC, CD11b-PE y GLAST-APC 1:100). Después de 15 min de incubación en oscuridad, se añadieron 200 μ l de PBS y la intensidad

de fluorescencia fue analizada en el citómetro de flujo, registrándose un total de 10.000 eventos/condición. Para el análisis de los datos se consideró el valor de la mediana y los datos se relativizaron en todos los casos frente a la basal (en cultivos celulares) o al WT Salino (en el caso de los experimentos *in vivo*).

4.2.3. Evaluación de la masa mitocondrial mediante Inmunofluorescencia con Mitotracker Green (Mtg)

Tras incubar las células durante 48 h con PNU282987, éstas se lavaron con PBS y se tiñeron con la sondas fluorescentes Mtg (100 nM) y Hoechst (1 µg/ml) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se tomaron fotos en el microscopio confocal con una amplificación de 63X. Las imágenes que se muestran corresponden a la proyección máxima.

4.2.4. Medida de las copias de ADN mitocondrial

Una vez que el experimento había finalizado, las células se lavaron con PBS y el ADN se aisló tal y como se describe a continuación. Las células se lisaron con 500 µl de tampón compuesto por: 1 M Tris-HCl (pH 8), 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 10 % SDS y 0.5 mg/ml proteinasa K. Después de 2 h a 55 °C se añadieron 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a una solución compuesta por 0,7 (v/v) de isopropanol (350 µl) y 1/10 + 50 % (v/v) de acetato de sodio 2 M (75 µl). Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13.000 r.p.m. y los sedimentos se lavaron con etanol al 70 %. Después de una nueva centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se dejaron secar los sedimentos al aire, los cuales fueron posteriormente resuspendidos en H₂O. El ADN fue amplificado por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: COII (sub-unidad II de la citocromo oxidasa): F- CATTATTCCTAGAACCAGGCAGAC y R- GAATTAATTCTAGGACGATGGGC; β-actina: F- CACCTTCCAGCAGATGTGGA y R- AGCATTTGCGGTGGACGATGG. El ratio COII/β-actina representa el ADNmit/ADNn.

4.2.5. Western blot

Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 4.1.7. Los anticuerpos empleados para el presente Objetivo fueron: anti-p-AMPKα [pT172] (1:1000, Invitrogen), anti-

AMPK α (1:500; Invitrogen), anti-p-CREB [Ser133] (1:1000 Cell Signalling), anti-CREB (1:1000; Cell Signalling), anti-HO-1 (1:1000; Santa Cruz), anti-PGC-1 α (1:1000; Cayman Chemical), anti-MnSOD (1:1000; Stressgen), anti-Citocromo c (1:1000; BD PharMingen), anti p-85-PI3K (1:50000; Merck Millipore), anti-tubulina (1:10000; Calbiochem) y anti- β -actina (1:100.000; Sigma)

4.2.6. Medida de la Tasa de Consumo de Oxígeno (TCA) en células en cultivo

La Tasa de Consumo de Oxígeno (TCO) se midió empleando el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) que se denominará Seahorse de ahora en adelante. Para obtener una monocapa homogénea de células se sembraron 150.000 células/pocillo en placas XF24 (Seahorse Bioscience) y se realizaron los experimentos a los 7-10 DIV.

Para estudiar el efecto del PNU282987 sobre la respiración celular, los cultivos se trataron con 10 μ M PNU282987 +/- inhibidores (α -Bgtx 100 nM o SnPP 3 μ M) durante 48 h. El día del ensayo se incubaron las células en medio DMEM no tamponado (suplementado con 25 mM de glucosa, 1 mM de piruvato y 2 mM de glutamina) y se mantuvieron a 37° C en un incubador libre de CO₂ durante 1 h con el objetivo de equilibrar las células previamente al experimento. Durante este tiempo, se adicionaron los tratamientos pertinentes (PNU282987, α -Bgtx, SnPP). El cartucho de calibración (Seahorse Biosciences) se equilibró durante la noche a 37 °C en una atmósfera libre de CO₂ y previamente al experimento se cargó con DMEM no tamponado (puerto A), 5 μ g/ml oligomicina (puerto B), 500 μ M DNP (2,4-dinitrophenol; puerto C), and 1 μ M rotenona + 1 μ M antimicina A (puerto D), todos los compuestos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid). Mediante el desarrollo de este protocolo pudimos calcular los siguientes parámetros que se muestran gráficamente en la **Figura 8**:

- Respiración basal: refleja las demandas energéticas de la célula ante situaciones basales. Se calcula a partir de la TCO antes de la adición de ningún compuesto.
- Respiración acoplada a la síntesis de ATP: la disminución en la TCO tras la adición del inhibidor de la ATP sintasa, oligomicina, representa la porción de la respiración basal que se usa para sintetizar ATP.

- Fuga de protones: remanente de la TCO basal que no está acoplada a la síntesis de ATP.
- Respiración máxima: la subida en la TCO tras la adición de un desacoplante mitocondrial (DNP, FCCP, etc). Representa la máxima capacidad respiratoria que la célula puede alcanzar ante una situación de demanda energética.
- Respiración no mitocondrial: tras la adición del cocktail AA + Rotenona se impide la entrada de electrones a la CTE al bloquear los complejos III y I, respectivamente. Como consecuencia, la respiración cae bruscamente y la TCO remanente sería consumo de oxígeno no mitocondrial. Este dato fue sustraído a todos los anteriores.

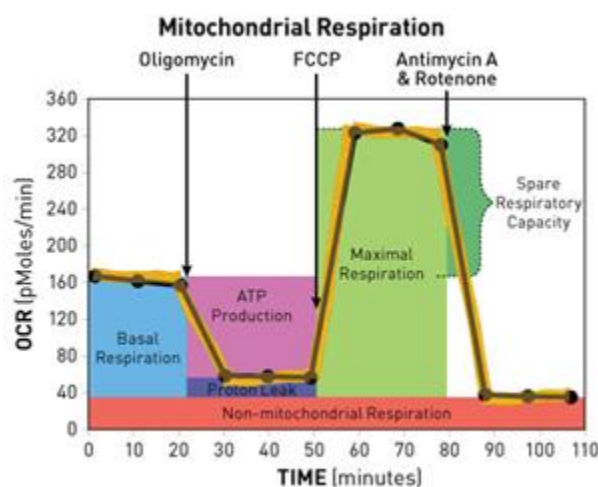


Figura 8. Gráfico representativo de la medida de la TCO mediante Seahorse. Imagen disponible en la página web de Agilent Technologies [http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-\(seahorse\)/mitochondrial-respiration-the-xf-cell-mito-stress-test](http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-(seahorse)/mitochondrial-respiration-the-xf-cell-mito-stress-test)

En todos los experimentos se calculó la concentración de proteína en cada pocillo mediante el kit comercial Pierce BCA (Thermo Scientific) de cara a poder normalizar los resultados.

4.2.7. Ensayo de luciferasa

Para la realización de este ensayo se empleó la línea inmortalizada MEF (del inglés, *mouse embryonic fibroblast*) derivada de ratones C57bl/6 salvajes. Para realizar las tranfecciones se empleó Lipofectamina 2000TM con 100 ng de un plásmido portador de 2 kb del promotor de PGC-1 α unido al gen reportero de la luciferasa (Borniquel et al., 2010).

Adicionalmente, las células también fueron transfectadas con 200 ng de un plásmido portador del factor de transcripción Nrf2 (pcDNA3.1-Nrf2-V5, cedido amablemente por John Huyes (McMahon et al., 2003)) o con su correspondiente plásmido vacío como control (pcDNA3.1). Transcurridas 24 h tras la transfección, las células fueron tratadas durante 48 h con sulforafano 10 μ M o vehículo (DMSO). La actividad luciferasa fue determinada mediante luminiscencia empleando el *Dual-luciferase Reporter Assay System* (Promega).

4.2.8. Vectores adenovirales e infecciones

Para silenciar la proteína PGC-1 α se empleó shARN (del inglés, *small hairpin*, ARN corto en forma de horquilla) clonado en un vector de virus adeno-asociado. El Ad-sh-PGC-1 α fue generado en el laboratorio de la Dr. M. Monsalve empleando el sistema “*pSilencerTM Adeno 1.0 Cytomegalo-virus Promoter System*” de Ambion (Carlsbad, CA) (Olmos et al., 2013).

Antes de realizar las infecciones, se reemplazó el medio celular por medio fresco y se infectaron las células sembradas en placas de 48 pocillos durante 8 h con 0,6 μ l de Ad-sh-Control/Ad-sh-PCG-1 α ($5 \cdot 3 \cdot 10^{11}$ partículas virales/ml). Transcurrido dicho tiempo se cambió el medio para permitir la recuperación celular durante la noche. A continuación, se realizaron los tratamientos oportunos los cuales se mantuvieron durante 48 h. Se controló la efectividad del silenciamiento midiendo la expresión de PGC-1 α mediante Western-blot.

4.2.9. Tratamientos animales

Los experimentos *in vivo* se realizaron empleando ratones de la cepa C57bl/6 de 8-10 semanas de edad. El PNU282987 se administró a una dosis de 10 mg/kg por inyección intraperitoneal (i.p.) 2 veces/día durante 2 días. Se eligió esta dosis ya que resultó efectiva en experimentos previos del grupo (Parada et al., 2013a); 10 mg/kg es además la dosis que demuestra mayor efectividad en curvas de dosis realizadas por otros investigadores (Andreasen et al., 2012; Redrobe et al., 2009). Todos los animales empleados fueron machos y los experimentos se realizaron en el Gabinete Veterinario de la Facultad de Medicina de la UAM.

Los animales $\text{LysM}^{\text{Cre}}\text{Hmox1}^{\Delta/\Delta}$ se generaron en la UAM a partir de ratones C57bl/6 $\text{Hmox1}^{\text{LoxP}}$ x LysM^{Cre} (Parada et al., 2015). Los animales LysM^{Cre} se caracterizan por expresar la recombinasa Cre bajo el promotor de la recombinasa LysM (que se expresa únicamente en la línea mieloide). Los animales $\text{Hmox1}^{\text{LoxP}}$ presentan el gen de la HO-1 flanqueado por regiones LoxP, sitio de acción de la recombinasa Cre. Así, los animales $\text{LysM}^{\text{Cre}}\text{Hmox1}^{\Delta/\Delta}$ no expresan la enzima HO-1 específicamente en las células de la línea mieloide. Los animales $\text{Hmox1}^{\text{LoxP}}$ se generaron en el laboratorio del Dr. Masayuki Yamamoto (Tohoku University Graduate School of Medicine) (Mamiya et al., 2008) y se obtuvieron a partir de RIKEN BioResource Center (B6J.129P2 $\text{Hmox1}^{\text{tm1Mym}}$). Los animales C57bl/6 LysM^{Cre} se generaron en el laboratorio del Dr. Forster (Clausen et al., 1999) y se obtuvieron a partir de Jackson Laboratory (B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Stock Number:004781). Todos los experimentos se realizaron en animales entre 8-10 semanas de edad.

Los ratones $\text{PGC-1}\alpha^{+/+}$ y $\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$ fueron generados inicialmente por el Dr. Bruce Spiegelman (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School) y tras transferencia de embriones se estableció una colonia en el Instituto de Investigaciones Biomédicas por el grupo de la Dr. M. Monsalve. Los animales se emplearon entre 8-10 semanas de edad.

4.2.10. Aislamiento de microglía del cerebro adulto y análisis de la masa mitocondrial

Para aislar la población microglial del cerebro adulto, se extrajeron los cerebros y se homogeneizaron mecánicamente en PBS y se disgregaron pasándolos a través de un filtro de 70 μM . Posteriormente, se centrifugaron a 600 g durante 6 minutos y los sobrenadantes se resuspendieron en 3 ml de Percoll al 70 %. Sobre este homogenado se fue añadiendo de manera muy lenta Percoll a distintas concentraciones: 50 %, 35 % y 0 %, generándose así un gradiente de densidad. Este gradiente discontinuo se centrifugó a 2.000 g durante 20 min. Tras la centrifugación, las células microgliales se localizan en la interfase entre 70 y 50 %. Mediante una pipeta de vidrio se recogió dicha interfase y se enrasó hasta 15 ml de PBS para asegurar la eliminación del Percoll. La pureza de la población aislada se determinó mediante citometría de flujo. Para ello, las células se tiñeron con CD45-FITC (marcador de macrófagos), CD11b-PE (marcador de microglía) and GLAST-APC

(marcador de astrocitos) (Miltenyi Biotec) todos a una dilución 1:100. La población microglial se caracteriza por ser CD11b⁺, GLAST⁻ y expresar bajos niveles de CD45 (Henry et al., 2009) Se determinó la pureza de dicha población calculando el porcentaje de células CD11b⁺ respecto al total de células registradas por citometría de flujo.

4.2.11. Análisis estadístico

Los resultados se representan como media \pm e.e.m. empleando para el análisis estadístico el programa GraphPad. Todos los resultados se relativizaron de manera intra-experimental con respecto a la situación Basal (experimentos *in vitro*) o al WT salino (experimentos *in vivo*). Los análisis estadísticos se realizaron empleando los siguientes tests: t-test pareado, ANOVA de una vía seguido del test de Newman-keuls y ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4.3. Objetivo 3: Estudio de las implicaciones fisiológicas y terapéuticas de la activación del $\alpha 7$ nAChR microglial en el control de la inflamación en animales adultos y envejecidos

Todos los procedimientos experimentales descritos para el presente capítulo se realizaron en el laboratorio del Dr. Jonathan Godbout, en la Ohio State University (Columbus, Ohio).

4.3.1. Tratamientos animales

En el presente capítulo se emplearon ratones macho de la cepa BALB/c tanto adultos (3-4 meses de edad) como envejecidos (18-20 meses de edad). Los animales adultos se obtuvieron a partir de la colonia mantenida en el Gabinete Veterinario de la Ohio State University y los animales envejecidos se obtuvieron del *National Institute of Aging*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la normativa del Instituto Nacional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el comité institucional de la Ohio State University (*The Ohio State University Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee*).

4.3.2. Canulación intracerebroventricular

Para realizar la canulación intracerebroventricular (i.c.v) los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg i.p.) + xyalizina (10 mg/kg i.p.) y se colocaron en un estereotáxico. Se hizo una incisión de 1,5 cm en la piel y una vez que se localizó el punto anatómico Bregma, se introdujo una cánula de acero inoxidable de calibre 26 a nivel ventricular siguiendo las siguientes coordenadas: lateral 0.5 mm y antero-posterior 1.2 mm en relación a Bregma; y horizontal -2 mm frente a la duramadre. Se introdujeron dos tornillos adyacentes a la cánula para favorecer el anclaje y se selló empleando cemento cráneo-plástico. Para prevenir infecciones, la cánula se mantuvo tapada todo el tiempo. Como analgésico se empleó *Buprinex* (111 μ g/kg, sub-cutáneo) el cual se administró una vez que el animal se recuperó de la anestesia y 12 h post-operación. Se controló que los animales no sufrieran una pérdida de peso significativa tras la cirugía y los experimentos no se realizaron hasta al menos 7 días tras la operación, asegurando así la recuperación total de los animales.

4.3.3. Inyecciones centrales y periféricas

En todos los experimentos el LPS (serotipo 0127: B8, Sigma, St Louis, MO) se inyectó a una dosis de 0,33 mg/kg por vía i.p. Los animales que no recibieron LPS fueron inyectados con el mismo volumen de PBS como control. La dosis de LPS empleada se caracteriza por generar una respuesta neuro-inflamatoria transitoria caracterizada por un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, una pérdida de peso corporal, una disminución de la interacción social y de la locomoción (Norden et al., 2015). Estas dos últimas características se engloban dentro del llamado comportamiento tipo enfermizo (del inglés *sickness behaviour*). En todos los experimentos se analizó la pérdida de peso corporal, los niveles de interacción social y la locomoción a distintos tiempos post-LPS (0, 4, 8 y 24 h) así como la expresión de citocinas inflamatorias por qPCR a tiempo final (4 h o 8 h).

El PNU282987 se administró tanto periféricamente (i.p.) como de manera central (i.c.v.). Para las inyecciones intraperitoneales se administró a una dosis de 10 mg/kg. En el caso de la administración central, se inyectaron 10 µg en un volumen total de 2 µl. Los animales que no recibieron el compuesto fueron inyectados con la misma cantidad de PBS + DMSO como control.

4.3.4. Test de interacción social

Para realizar estos experimentos se introdujo un animal juvenil (alrededor de 1 mes de edad) de la misma cepa en la jaula del animal objeto de estudio durante 10 minutos y se grabó mediante vídeo. Posteriormente, se contabilizó el tiempo que el animal objeto de estudio invertía en investigar al animal juvenil (olerle, rastrearle, etc). Se cambió el animal juvenil para cada uno de los tiempos, de modo que nunca se repitió una pareja de animales. Los resultados se normalizaron frente a los obtenidos por ese mismo animal previamente a la inyección del LPS (tiempo 0 h), dato que se consideró como el 100 % de interacción social.

4.3.5. Test de locomoción

Para realizar este test se grabó a los animales durante 5 minutos dentro de sus cajas. Para el análisis, las cajas se dividieron de manera virtual en 8 cuadrantes idénticos y se contabilizó el número de cruces realizados por el animal durante los últimos 3 minutos (ya que los 2 minutos iniciales sirvieron como habituación del animal). Los resultados se

normalizaron frente al número de cruces del mismo animal en el tiempo 0, dato que se consideró como el 100 % de locomoción.

4.3.6. Medida de la expresión de citocinas en la microglía del cerebro adulto mediante qPCR

El protocolo para el enriquecimiento en población microglial del cerebro adulto se realizó siguiendo el mismo protocolo especificado 4.2.10. Una vez aislada la población microglial se procedió a aislar el ARN mensajero (ARNm) empleando el kit comercial *PrepEase kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARNm se determinó por espectrofotometría (Eppendorf, Nueva York) y se realizó la transcripción reversa a ADNc (ADN copia). El análisis de la expresión de citocinas se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando oligonucleótidos unidos a la sonda Taqman (*Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assay-on-Demand Gene Expression protocol*). El sistema de detección empleado fue *ABI PRISM 7300-sequence detection system*. Los niveles de expresión relativa de los genes se calcularon utilizando el método comparativo de Livak o $2^{-\Delta\Delta C_t}$, el cual se basa en la comparación de la expresión del gen de interés con la de uno de expresión constitutiva (GAPDH -gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa-), y en la posterior comparación entre los diferentes tratamientos ($\Delta\Delta C_t$). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

4.3.7. Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6

Para analizar la expresión de la citocina IL-6 se extrajo sangre mediante punción cardíaca. El volumen extraído se centrifugó a 6.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se separó la fracción plasmática (sobrenadante). La detección de la citocina IL-6 se realizó mediante ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) empleando el kit *BD OptEIA Mouse IL-6 ELISA* y siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Brevemente, se cubrió la superficie de placas de 96 pocillos con anticuerpo frente a IL-6 a 4 °C durante toda la noche. Una vez preparadas las placas, se lavaron 3 veces y se añadieron 100 µl/pocillo de la muestra problema o de estándares de IL-6 a concentraciones conocidas (0–1000 pg/ml), y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar la placa, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario unido a estreptavidina peroxidasa y, posteriormente, se incubó durante 15 min con el

sustrato de la peroxidasa (*tetramethylbenzidine*) dando lugar a un producto de color azul que puede ser detectado espectrofotométricamente. La reacción se paró mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) y la absorbancia se midió a 450 nm empleando el lector *Synergy HT Plate Reader*. Los límites de detección de IL-6 con este ensayo son de 10 ng/ml.

4.3.8. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se empleó el Software GraphPad. Los resultados se representan como media \pm e.e.m.. Las comparaciones entre los distintos tratamientos (Salino, LPS y LPS+PNU282987) en un determinado tiempo se realizaron mediante ANOVA de una vía empleando el test de Newman-keuls como *post-hoc*. Para comparar varios tratamientos a distintos tiempos se realizó un ANOVA de dos vías y como *post-hoc* se empleó el test de Bonferroni. Se consideraron que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4.4. Objetivo 4: Estudio del efecto de la activación del $\alpha 7$ nAChR a nivel neuronal, centrándonos en su efecto sobre la biogénesis mitocondrial y la formación de espinas dendríticas

Parte de los protocolos descritos en la presente sección se realizaron en el laboratorio del Dr. Peter Penzes, en la Northwestern University (Chicago, Illinois).

4.4.1. Materiales

El medio Neurobasal, el SBF, el suplemento de B27 y la Lipofectamina 2000 proceden de Invitrogen; la papaína, DNAsa1, EDTA, L-cisteína y la poli-D-lisina de Sigma; el APV de Abcam Biochemicals; el DMEM y el HEPES proceden de Corning.

4.4.2. Cultivos primarios neuronales

Los cultivos primarios neuronales se realizaron a partir de embriones de ratas Sprague-Dawley con 18 días de gestación (E18). Brevemente, tras sacrificar a la rata, se extrajeron los cerebros de los embriones y se diseccionaron las cortezas en frío. Una vez diseccionadas todas las cortezas, se transfirieron a un tubo de 15 ml que contiene 3 ml de la siguiente solución: 20 U/ml de papaína, 2 U/ml de DNAsa1, 0,5 mM de EDTA y 1 mM de L-cisteína en medio Neurobasal + B27 + penicilina/estreptomicina (atemperado a 37 °C). Los tejidos se incubaron a 37 °C durante 15 min en dicha solución. Posteriormente, se retiró el medio, se añadió medio Neurobasal completo (medio Neurobasal + 2 % B27 + 0,5 mM de glutamina + 1 % de penicilina/estreptomicina) y se disgregó mecánicamente el tejido mediante pipeteo, evitando generar burbujas. Una vez finalizada la disgregación, la suspensión celular se centrifugó a 200 g durante 2 min. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio Neurobasal completo + 5 % de SBF. Para los experimentos de TCO se sembraron 150.000 células/pocillo en placas XF24 (Seahorse Bioscience) y para el análisis de espinas dendríticas se sembraron 300.000 células/pocillo en cubres de cristal de 3,5 cm² colocados en placas de 12 pocillos. Tanto las placas como los cubres fueron previamente pre-tratados con polilisina. Transcurrida 1 h tras la siembra, se retiró el medio para eliminar debris y células no adherentes, y se añadió medio Neurobasal completo. Tras 4 días, se realizó un cambio parcial de medio y se suplementó éste con 200 μ M del inhibidor de receptores NMDA APV (del inglés, *DL*-2-

amino-5-phosphonopentanoic acid). Se realizaron cambios parciales de medio 2 veces por semana.

4.4.3. Transfecciones y tratamientos farmacológicos

Para el análisis dendrítico los cultivos neuronales de 21 días se transfectaron con plásmido de GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*). Para realizar la transfección se prepararon (por pocillo) 50 µl de medio DMEM + 10 mM Hepes + 3 µg de plásmido de GFP + 3 µl de Lipofectamina 2000. Esta solución se mezcló vigorosamente y se dejó 20 minutos a 37 °C para favorecer la formación de los liposomas. Antes de la transfección se retiró el medio a las células, las cuales fueron tratadas con el siguiente medio: Neurobasal + B27 + Glutamine + APV, pero sin antibióticos. Se adicionaron los 50 µl de medio de transfección lentamente y a lo largo de toda la superficie del pocillo. El tiempo de transfección fue de 4 h, transcurrido el cual se reemplazó el medio de transfección por Neurobasal completo + APV. Transcurridas 72 h tras la transfección se procedió a realizar los tratamientos farmacológicos durante 48 h adicionales (PNU282987 10 µM).

4.4.4. Tasa de consumo de oxígeno (TCO) e inmunofluorescencia de Mtg

Para medir la TCO en cultivo neuronal se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 4.2.6. La inmunofluorescencia con Mtg se realizó siguiendo el protocolo descrito en 4.2.3. En ambos casos, los experimentos se realizaron con cultivos de 10 días.

4.4.5. Marcaje de espinas dendríticas

Para estudiar la morfología dendrítica las células transfectadas con GFP se fijaron con paraformaldehído/sucrosa 3,7 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 10 min con PBS, se añadió durante 1 h la solución de permeabilización/bloqueo: 4% NGS (del inglés, *normal goat serum*), 0.4% BSA, 0.1% Triton en PBS. Tras este periodo de bloqueo/permeabilización se incubó el anticuerpo primario anti-GFP (1:10.000, Abcam) diluido en la solución de permeabilización/bloqueo a 4 °C durante toda la noche. Transcurrida la incubación se hicieron tres lavados con PBS y se incubó el anticuerpo secundario (*Chicken* Alexa-488, 1:750) 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron los cubres sobre porta-objetos empleando ProLong (Life Technologies).

4.4.6. Análisis de Sholl

Para analizar la arborización sináptica se empleó el método de Sholl, consistente en trazar circunferencias concéntricas desde el soma y analizar el número de cortes de las dendritas en cada circunferencia. Para ello, una vez finalizado el marcaje de las espinas, se tomaron imágenes en un plano único con un microscopio confocal (Zeiss LSM 5 Pascal) empleando un objetivo de 10X y las imágenes se exportaron al programa ImageJ. Se crearon imágenes binarias y se trazó toda la arborización neuronal (dendritas basales y dendritas apicales). El análisis se realizó empleando el complemento *Fiji Sholl analysis plug-in* y fijando el centro en el soma de la neurona. El análisis de Sholl se realizó tanto en el total del contenido dendrítico como de manera independiente en dendritas basales y apicales, trazando en todos los casos círculos concéntricos cuyo diámetro ascendía 25 μm sucesivamente.

4.4.7. Análisis cuantitativo de la morfología de las espinas dendríticas y de la densidad de espinas

Se tomaron imágenes de las neuronas teñidas por inmunofluorescencia con un microscopio Nikon C2+ con el software de Nis-Elements, empleando un objetivo de inmersión de 63X y una resolución de 1.024 x 1024 píxeles. Se tomaron planos individuales cada 0,250 μm . Los parámetros de adquisición se fijaron para cada experimento y se mantuvieron constantes en las distintas condiciones del mismo. Se tomaron imágenes de ramificaciones secundarias y terciarias de la dendrita apical de neuronas piramidales sanas. Las imágenes tomadas fueron exportadas a Fiji para realizar el análisis. Para analizar el tamaño de la cabeza de la espina se trazaron manualmente las mismas y se calculó su área. Se analizaron 50 espinas/neurona. Para analizar la densidad dendrítica se trazaron manualmente todas las espinas en 100 μm /neurona y se contó el número de espinas en dicha longitud. Los datos se representaron como número de espinas/10 μm . Todos los análisis fueron ciegos. Se analizaron un mínimo de 4 neuronas/cultivo de 2 cubres independientes por condición y al menos de 2 cultivos distintos.

4.4.8. Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se representaron como media y e.e.m. El análisis empleado fue t-

Student pareado para determinar diferencias entre dos variables; considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Objetivo 1

La activación del $\alpha 7$ nAChR protege frente al estrés oxidativo a través de la inducción de la enzima HO-1

Resumen

En este Objetivo se describe como una pequeña inflamación y disfunción mitocondrial mantenidas en el tiempo orquestan una elevada producción de ERO, factor que parece ser clave para desencadenar proteinopatía y neurodegeneración en cultivos organotípicos de hipocampo de rata. Así, hemos generado un modelo *in vitro* basado en el EO de utilidad para la evaluación farmacológica de potenciales compuestos neuroprotectores. Además, describimos como en este modelo la activación del $\alpha 7$ nAChR previene de todas las alteraciones descritas mediante un mecanismo dependiente del eje Nrf2/HO-1 (**Figura 9**).

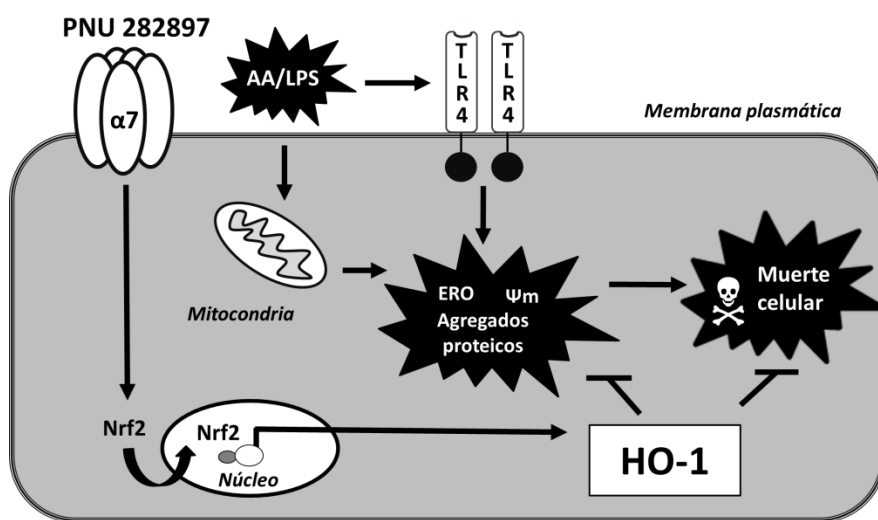


Figura 9. Resumen gráfico de los resultados relativos al Objetivo 1. La activación del $\alpha 7$ nAChR previene del EO, formación de agregados proteicos aberrantes y muerte celular producidos por la combinación LPS/AA mediante un mecanismo dependiente de HO-1.

5.1.1. Efecto del tratamiento sub-crónico con LPS y antimicina A, solos o en combinación, sobre la viabilidad de los cultivos organotípicos de hipocampo de rata

De cara a establecer las condiciones adecuadas que generasen un ambiente de EO en el cultivo organotípico, se realizaron curvas concentración-respuesta con ambos estímulos por separado y a distintos tiempos de exposición, tal y como se detalla a continuación. Los cultivos se estabilizaron durante 4 días, transcurridos dicho tiempo se trataron con concentraciones crecientes de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (0,1, 1 y 10 ng/ml) y antimicina A (AA) (0,01, 0,1 y 1 μ M) y, se evaluó la muerte celular en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo mediante la sonda fluorescente ioduro de propidio (IP) tanto a los 4 como a los 7 días de tratamiento.

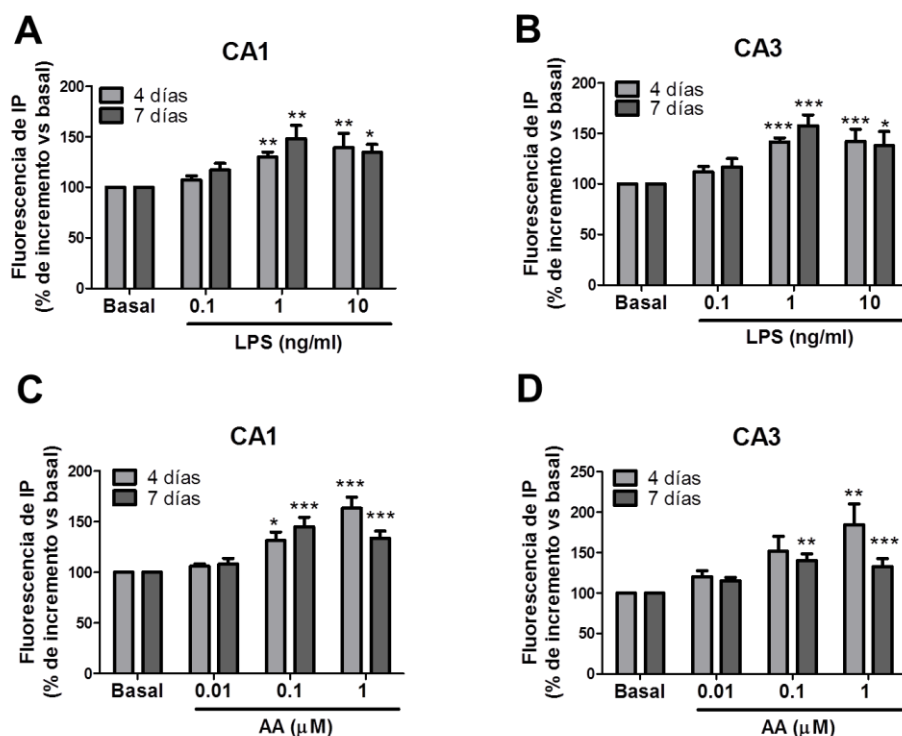


Figura 10. Efecto del tratamiento con distintas concentraciones de LPS y AA durante 4 y 7 días sobre la viabilidad celular de los cultivos organotípicos de hipocampo. Los histogramas muestran la cuantificación de la muerte celular medida mediante la sonda IP y normalizado respecto a la fluorescencia de la condición Basal. Se muestra el efecto de distintas concentraciones de LPS (0,1, 1 y 10 ng/ml) (A, B) y de AA (0,01, 0,1 y 1 μ M) (C, D) en las regiones CA1 (A, C) y CA3 (B, D) del hipocampo. Los resultados corresponden a la media \pm e.e.m. de 6-8 animales. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs la condición Basal.

El tratamiento con LPS a 1 y 10 ng/ml incrementó significativamente la muerte celular en las regiones CA1 (**Fig. 10A**) y CA3 (**Fig. 10B**); sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon las variables 4 días y 7 días. Cuando se evaluó la citotoxicidad de la AA (**Fig. 10C y 10D**), se observó una muerte celular significativa a partir de la concentración de 0,1 μ M sin observarse, tampoco en este caso, diferencias entre los tiempos de exposición de 4 y 7 días. Curiosamente, aunque la AA 1 μ M mostró un efecto significativamente superior que 0,1 μ M a 4 días, su toxicidad se redujo cuando se midió la viabilidad tras 7 días de incubación. Esta observación podría ser debida al hecho de que a tiempos largos de exposición con el tóxico la integridad de las rodajas se encuentra seriamente afectada.

En base a los resultados expuestos, decidimos estudiar el efecto de la combinación de 1 ng/ml de LPS más 0,1 μ M de AA a un tiempo de exposición de 4 días (**Fig. 11A**), tiempo que puede ser considerado sub-crónico dentro de los estudios *in vitro*. El LPS (1 ng/ml) y la AA (0,1 μ M), por sí solos incrementaron la muerte celular en un 11-12 % respecto a la situación basal en CA1 (**Fig. 11C**) y CA3 (**Fig. 11D**).

Curiosamente, la combinación de LPS y AA produjo un incremento en la fluorescencia del IP del 48 % en CA1 y del 56 % en CA3, valores similares a los obtenidos cuando se sometían las rodajas a AA 1 μ M. De esta manera, la combinación de concentraciones sub-tóxicas de LPS/AA produjo un incremento significativo de la toxicidad celular en comparación a la situación Basal y a los estímulos por separado, demostrando un efecto sinérgico. A lo largo del presente objetivo, nos referiremos como LPS/AA a la combinación de 1 ng/ml de LPS y 0,1 μ M de AA durante 4 días. Asimismo, se mostrarán únicamente los resultados obtenidos en la región CA1, puesto que no se observaron diferencias entre CA1 y CA3.

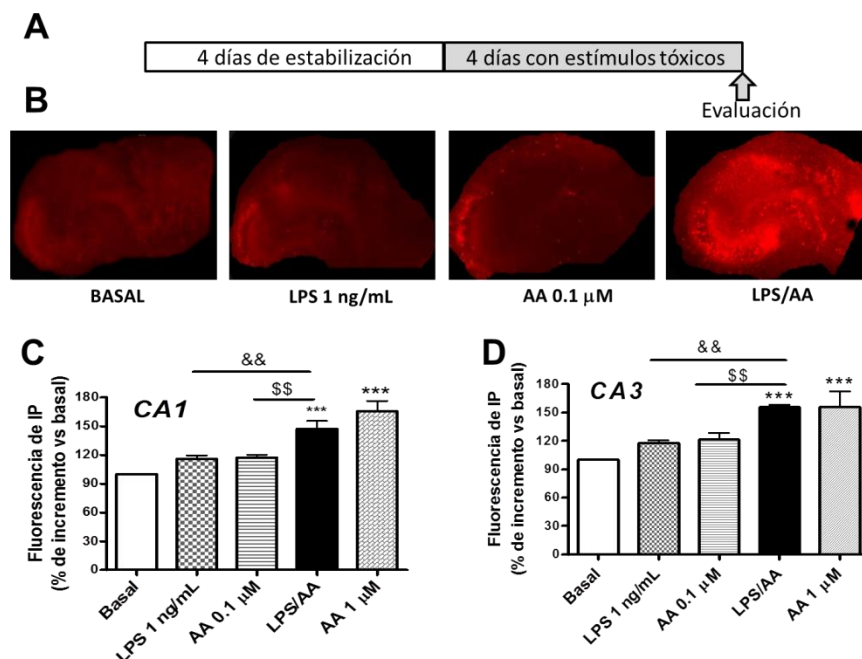


Figura 11. La combinación de bajas concentraciones de LPS y AA incrementa la vulnerabilidad de los cultivos organotípicos de hipocampo. (A) Protocolo experimental: tras la estabilización, las rodajas de hipocampo fueron tratadas durante 4 días con vehículo, 1ng/ml de LPS, 0,1 μ M de AA, la combinación de ambos LPS/AA o el control positivo AA 1 μ M. (B) Imágenes representativas de la fluorescencia de IP tomadas con un objetivo 2X. Se muestran los gráficos representativos de la muerte celular medida como fluorescencia de IP tanto en la región CA1 (C) como CA3 (D) del hipocampo. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 6 cultivos independientes. *** p <0,001 vs condición basal; && p <0,01 vs LPS 1 ng/ml; \$\$ p <0,01 vs AA 0,1 μ M.

5.1.2. Efecto de la combinación LPS/AA sobre la disfunción mitocondrial, el EO y la formación de agregados proteicos

Tal y como se describe a lo largo de la Introducción, tanto la disfunción mitocondrial como el EO son dos factores implicados en la patogenia de las ENDs. En este contexto, decidimos analizar si la combinación LPS/AA tendría algún efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ERO.

Para estudiar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial se empleó la sonda fluorescente TMRE (**Fig. 12A**). El LPS 1 ng/ml no produjo cambios en los niveles de fluorescencia de dicha sonda en comparación con la situación basal; mientras que la AA, al ser un bloqueante del complejo III mitocondrial, produjo un incremento significativo en la fluorescencia del TMRE al 153 ± 13 %. Cuando ambos estímulos se emplearon en

combinación, la fluorescencia incrementó hasta alcanzar 182 ± 17 %, aunque este incremento no fue significativamente superior a la variable AA.

Para caracterizar más a fondo el mecanismo tóxico inducido por la combinación LPS/AA decidimos estudiar la producción de ERO mediante el empleo de la sonda H_2DCFDA . Tal y como puede observarse en la **Fig. 12B**, tanto en las rodajas de hipocampo expuestas a 1 ng/ml de LPS como aquellas sometidas a AA $0,1 \mu M$ se obtuvo un incremento en la fluorescencia de dicha sonda (LPS: 38 ± 11 % ns; AA: 81 ± 28 % $p < 0,05$). Es interesante que cuando se sometieron las rodajas a ambos estímulos en combinación (LPS/AA), la producción de ERO se incrementó de manera notable (123 ± 11 %), siendo significativamente superior a ambos estímulos por separado.

Por otro lado, se ha demostrado que los receptores TLR4, sobre los cuales actúa el LPS, contribuyen a la producción de ERO a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa 4 (Nox4) (Park et al., 2004). De cara a estudiar la posible implicación de esta enzima en la producción de ERO observada, decidimos medir la producción del anión superóxido (O_2^-) – sub-producto de la acción de esta enzima- así como los niveles de expresión de la misma. No se observó un incremento significativo en los niveles de O_2^- (empleando la sonda DHE) con los estímulos por separado (LPS: $117,5 \pm 5,8$ %; AA: $123 \pm 9,75$ %); sin embargo, la combinación LPS/AA causó un incremento significativo en la producción de O_2^- ($155,5 \pm 6,4$ %) (**Fig. 12C**). Estos resultados se corroboraron con el análisis de la expresión de la enzima Nox4 por Western blot, observándose una inducción de la misma en la variable LPS/AA (**Fig. 12D**).

Partiendo del hecho de que la agregación proteica es un factor común en la patogenia de las ENDs, decidimos estudiar el efecto de la combinación LPS/AA sobre dicho parámetro. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia con Tioflavina-S, colorante que tiñe de manera específica agregados proteicos ricos en láminas β . La combinación LPS/AA produjo un incremento significativo en la fluorescencia de Tioflavina-S ($147,25 \pm 12,93$ %) (**Fig. 12E, 12F**), y dicho incremento de fluorescencia no se produjo en presencia de 1 mM del secuestrador de radicales libres N-acetil cisteína (NAC) (**Fig. 12F**). Estos resultados ponen de manifiesto que el ambiente pro-oxidante generado por la combinación LPS/AA participa de forma positiva sobre la formación de dichos agregados proteicos aberrantes.

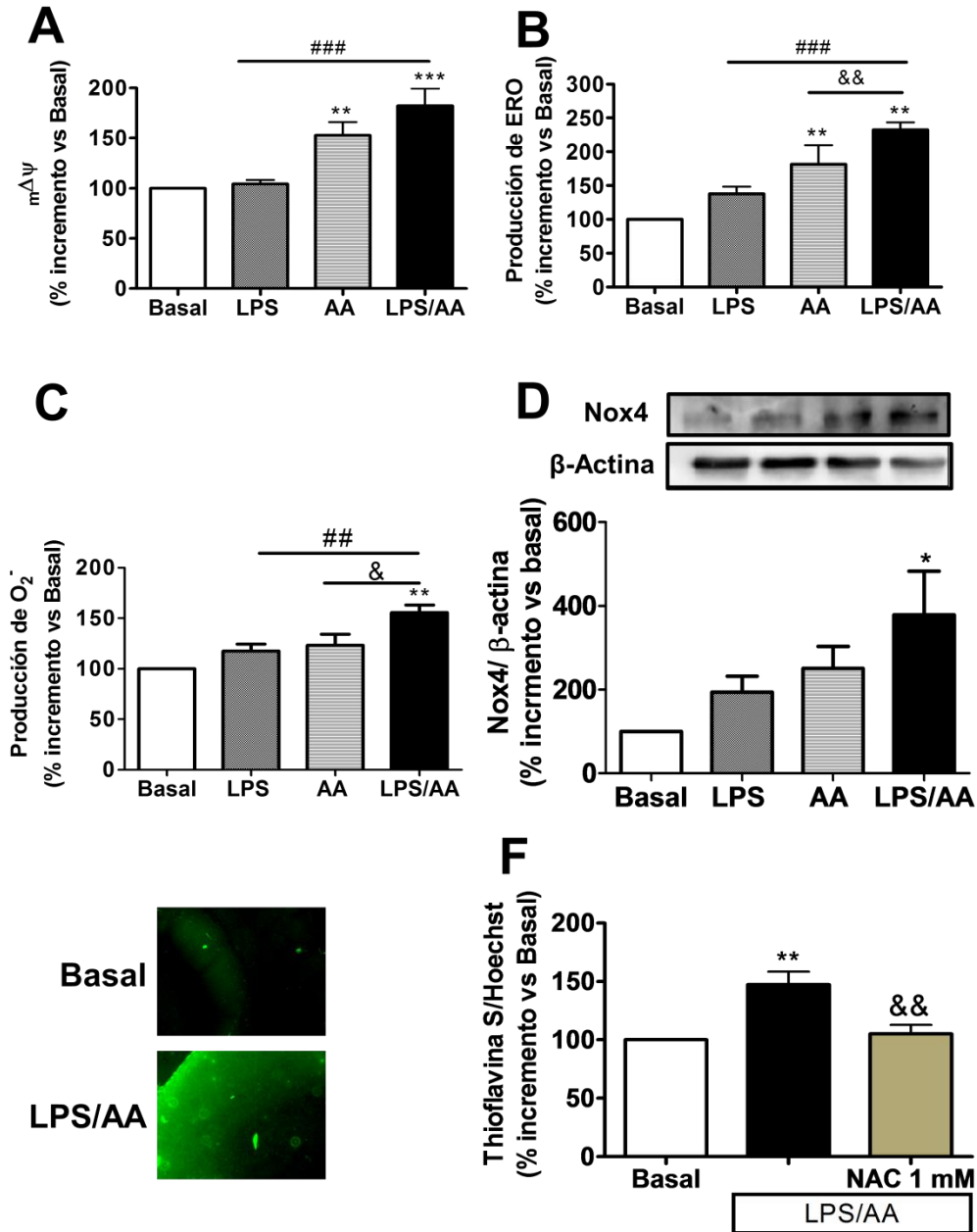


Figura 12. La combinación de LPS/AA altera el potencial de membrana mitocondrial, incrementa el EO, induce la expresión de Nox4 y aumenta la proteinopatía. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las sondas TMRE ($m\Delta\Psi$) (A), H_2DCFDA (ERO) (B) y DHE (radical O_2^-) (C) en la región CA1 del hipocampo corregidos frente a Hoechst. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 4-6 cultivos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Basal; ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ vs LPS; && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ vs AA. (D) Niveles de expresión de la proteína Nox4 medido mediante Western-blot. Los resultados muestran la media \pm e.e.m. de 4 cultivos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal. (E) Imágenes representativas de la fluorescencia de Tioflavina-S en las condiciones Basal y LPS/AA tomadas con un objetivo 10X. (F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Tioflavina-S en la región CA1 corregida respecto a Hoechst de las variables Basal, LPS/AA y LPS/AA + 1 mM NAC. Los resultados muestran la media \pm e.e.m. de 4 cultivos independientes. ** $p < 0,01$ vs Basal; ## $p < 0,01$ vs LPS/AA.

5.1.3. La activación del $\alpha 7$ nAChR induce la enzima HO-1 *via* Nrf2 y previene la muerte celular en los cultivos expuestos a LPS/AA

Estudios previos de nuestro grupo habían demostrado que la activación del $\alpha 7$ nAChR tiene efectos neuroprotectores en modelos asociados a la isquemia cerebral (Parada et al., 2013a; Parada et al., 2010) y EA (Del Barrio et al., 2011b), de ahí que en el presente trabajo nos planteásemos evaluar si la activación $\alpha 7$ nAChR podría tener también un efecto neuroprotector en este modelo de EO sub-crónico.

En primer lugar, analizamos si el agonista $\alpha 7$ nAChR, PNU282987, tenía la capacidad de activar al factor de transcripción Nrf2 en este modelo de neurodegeneración. Como se puede observar en la **Fig. 13A**, tanto en la situación basal como con la variable LPS/AA, la distribución de Nrf2 era principalmente citosólica, sin embargo, cuando las rodajas fueron co-tratadas durante 4 días con 10 μ M de PNU282987 se observó, de manera cualitativa, una translocación de Nrf2 al núcleo, indicando una mayor actividad del mismo. Estos resultados coinciden con un aumento en los niveles de expresión de enzimas dependientes de Nrf2, tales como HO-1 (**Fig. 13B**) y NQO-1 (datos no mostrados) en las rodajas tratadas con el agonista $\alpha 7$, datos que demuestran de manera indirecta la activación de dicho factor de transcripción. Finalmente, cuando se midió la viabilidad celular, se observó que el co-tratamiento con el PNU282987 previno la muerte celular causada por LPS/AA (**Fig. 13C**). Cabe destacar que estos efectos fueron específicos del $\alpha 7$ nAChR, puesto que la protección resultó abolida cuando se trataron las rodajas con 100 nM α -Bgtx (bloqueante $\alpha 7$); asimismo, el empleo de 3 μ M SnPP (inhibidor de la actividad de HO-1) también revirtió los efectos del PNU282987, indicando la implicación de HO-1 en el mecanismo neuroprotector activado por $\alpha 7$ nAChR. Con todo ello, demostramos que la activación del $\alpha 7$ nAChR tiene efecto neuroprotector en este modelo de EO mediante un mecanismo dependiente de la enzima HO-1.

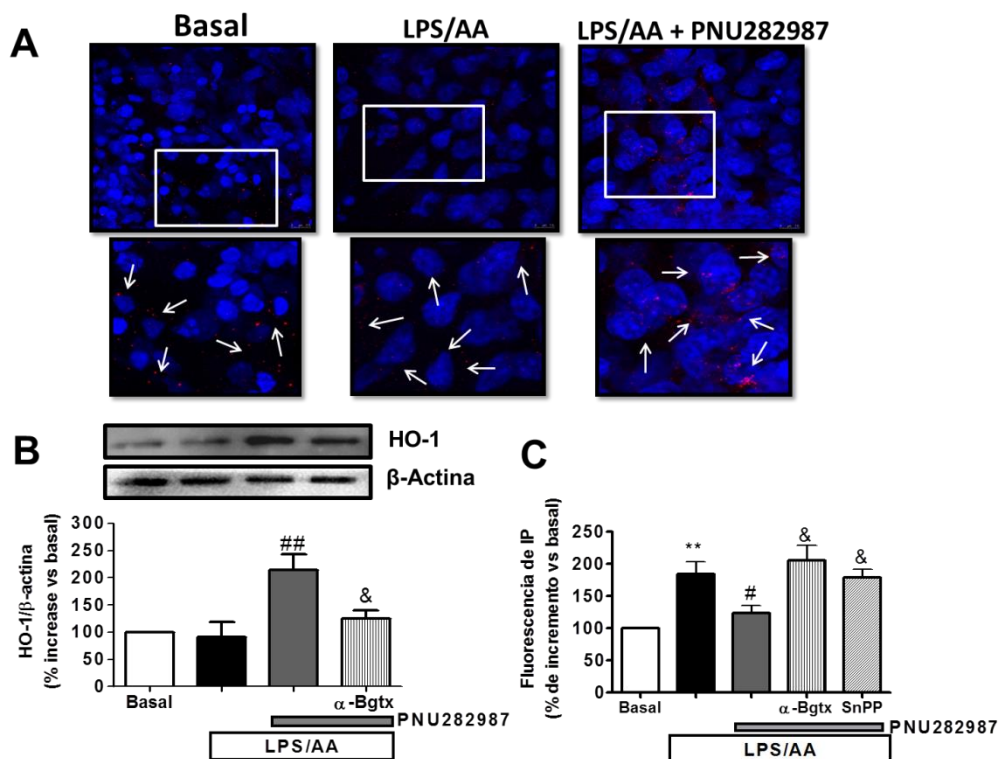


Figura 13. El co-tratamiento de las rodajas con el agonista del $\alpha 7$ nAChR, PNU282987 con el estímulo tóxico, activa la vía Nrf2/HO-1 y previene de la neurotoxicidad inducida por LPS/AA. (A) Imágenes representativas de la localización de Nrf2 tomadas en un microscopio confocal con un objetivo de 63X. (B) Niveles de expresión de la enzima HO-1 medido mediante Western blot. (C) Cuantificación de la muerte celular medida mediante la sonda IP en la región CA1 del hipocampo. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m. de 4 cultivos independientes. ** $p < 0,01$ vs Basal; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs LPS/AA; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ vs PNU282987.

5.1.4. El eje $\alpha 7$ nAChR/HO-1 controla la producción de ERO y la formación de agregados proteicos asociados a la combinación LPS/AA

De cara a analizar en mayor profundidad los efectos celulares derivados de la activación del $\alpha 7$ nAChR y de la inducción de HO-1 en el presente modelo de neurodegeneración, decidimos evaluar los efectos del PNU282987 sobre la producción de ERO y la proteinopatía derivadas de la combinación LPS/AA. Tal y como se había descrito con anterioridad, el tratamiento durante 4 días con LPS/AA aumentó de manera muy notable los niveles de ERO y esta consecuencia patológica fue prevenida mediante el co-tratamiento con PNU282987 (**Fig. 14A**), siendo estos efectos específicos del $\alpha 7$ nAChR y dependientes

de la acción de HO-1, ya que tanto α -Bgtx como SnPP revirtieron los efectos anti-oxidantes del PNU282987.

Partiendo de los resultados derivados de la **Fig. 11E**, donde parece que el EO es el responsable último de la generación de los agregados proteicos aberrantes en el presente modelo de neurodegeneración y dados los efectos anti-oxidantes previamente demostrados para el PNU282987, decidimos estudiar el efecto del agonista $\alpha 7$ sobre la proteinopatía derivada de la combinación LPS/AA. Como se muestra en la **Fig. 14B**, el co-tratamiento de las rodajas con el PNU282987 redujo la fluorescencia de Tioflavina-S a niveles cercanos a la basal; efecto que fue dependiente del $\alpha 7$ nAChR y de la actividad de HO-1.

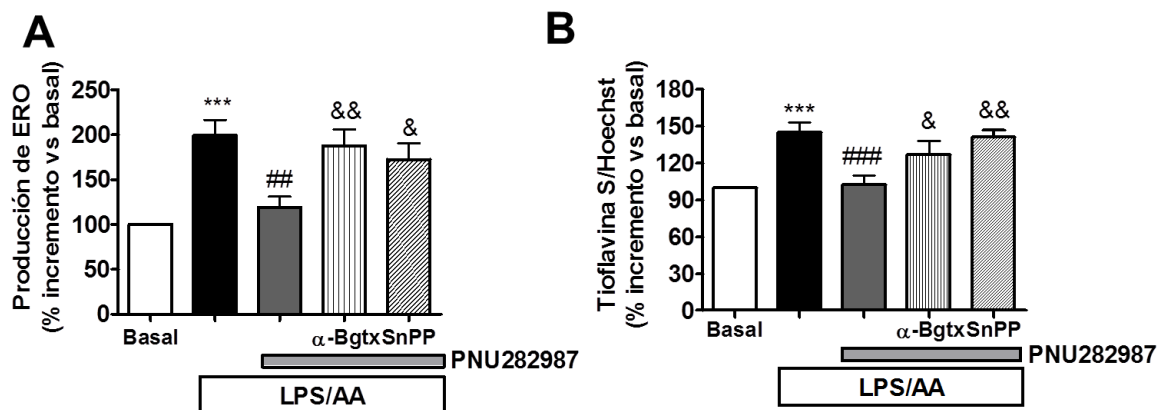


Figura 14. El tratamiento con PNU282987 previene la producción de ERO y la proteinopatía inducidas por LPS/AA mediante un mecanismo $\alpha 7$ nAChR y HO-1 dependiente. Los cultivos fueron tratados durante 4 días con LPS/AA \pm 10 μ M PNU282987 \pm 100 nM α -Bgtx ó 3 μ M de SnPP. **(A)** La producción de ERO se midió a través de la sonda fluorescente H₂DCFDA en la región CA1 y los datos fueron normalizados respecto a la sonda Hoechst. **(B)** La formación de agregados proteicos se midió a través Tioflavina-S en la región CA1 y se corrigió con Hoechst. Los datos muestran la media \pm e.e.m. de 5-8 cultivos independientes. *** p <0,001 vs Basal; ## p <0,01, ### p <0,001 vs LPS/AA; & p <0,05, && p <0,01 vs PNU282987.

En resumen, la activación del $\alpha 7$ nAChR fue capaz de atenuar la situación de EO y la formación de agregados proteicos en rodajas de hipocampo expuestas sub-crónicamente a la combinación LPS/AA mediante un mecanismo dependiente de Nrf2/HO-1 mostrando así un interesante perfil neuroprotector frente al EO asociado a las END

5.2. Objetivo 2

La activación de los $\alpha 7$ nAChRs activa la biogénesis mitocondrial en la microglía en un mecanismo dependiente del eje Nrf2/HO-1/PGC-1 α

Resumen

Los resultados derivados de este objetivo muestran cómo la activación del $\alpha 7$ nAChR, tanto *in vitro* como *in vivo*, produce un incremento en la masa mitocondrial en las células de la microglía a través de la activación de HO-1 y PGC-1 α , ambas expresadas a través del factor de transcripción Nrf2. Dada la disfunción energética que caracteriza a las ENDs, estos datos aportan nueva información acerca de cómo la señalización colinérgica $\alpha 7$ podría resultar de relevancia en el contexto de la neuroprotección.

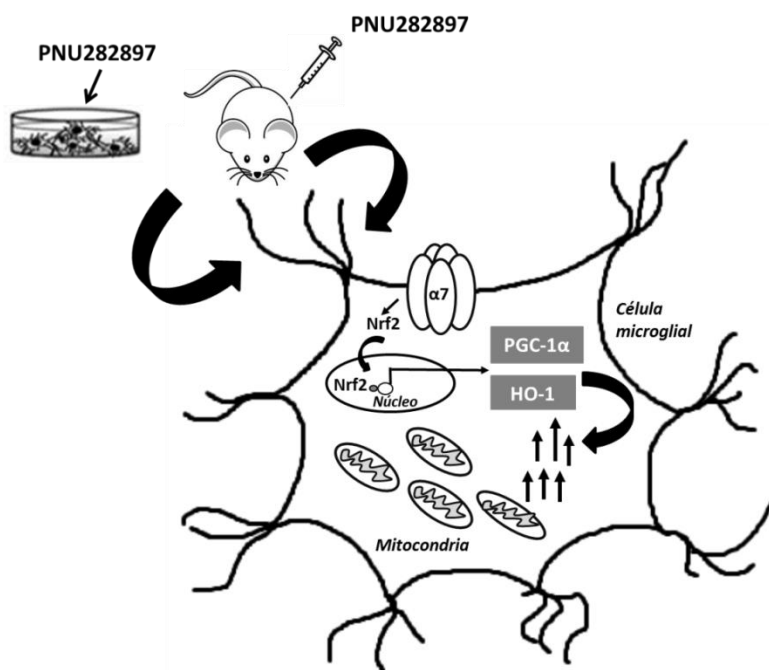


Figura 15. Resumen gráfico de los resultados relativos al Objetivo 2. La ruta de señalización $\alpha 7$ nAChR/Nrf2/HO-1/PGC-1 α activa la biogénesis mitocondrial en la microglía.

5.2.1. La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial en células gliales sin aumentar el estrés oxidativo

En la actualidad, el control de la masa mitocondrial está postulándose como una interesante estrategia para la neuroprotección. Esto, sumado al hecho de que la biogénesis mitocondrial parece ser un factor determinante para el paso a un fenotipo anti-inflamatorio, nos llevó a plantearnos estudiar el efecto de la activación $\alpha 7$ nAChR sobre la biogénesis mitocondrial en células gliales. Para ello, se trataron cultivos primarios mixtos de astrocitos y microglía con el agonista $\alpha 7$ PNU282987 10 μ M durante 48 h. Transcurrido dicho tiempo de tratamiento se analizaron los cambios en masa mitocondrial mediante diferentes estrategias experimentales. En primer lugar, se analizaron los cambios en el contenido mitocondrial empleando la sonda fluorescente Mitotracker-Green (Mtg) mediante citometría de flujo, observándose un incremento significativo en la fluorescencia en las células tratadas PNU282987 (**Fig. 16A**). Los cambios en masa mitocondrial fueron similares a los observados con el control positivo resveratrol 10 μ M. Adicionalmente, también se observó que el PNU282987 incrementó el ratio ADNmit/ADNn medido por PCR (**Fig. 16B**) así como el marcaje de Mtg estudiado por inmunofluorescencia (**Fig. 16C**). Los efectos positivos del PNU282987 sobre la generación de nuevas mitocondrias también se confirmaron de manera indirecta midiendo la expresión de las proteínas mitocondriales citocromo c (**Fig. 16D**) y MnSOD (**Fig. 16E**), mostrándose ambas incrementadas.

Puesto que la mitocondria es la principal fuente de EO y un excesivo EO resulta deletéreo para las células, quisimos comprobar si el tratamiento con el PNU282987 podría desencadenar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial o un incremento en la formación de radicales libres. Para estudiar la producción de ERO, la células se tiñeron con la sonda fluorescente H_2DCFDA ; sin embargo, no se observó que el incremento de mitocondrias inducido por el tratamiento con el PNU282987 produjese alteraciones a nivel del estado redox celular (**Fig. 16F**). Para analizar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial se incubaron las células con las sondas TMRE y Mtg, y se analizó por citometría de flujo cambios en el ratio TMRE/Mtg. Como puede observarse en la **Figura 16G**, el tratamiento con el agonista $\alpha 7$ no produjo alteraciones a dicho nivel. Con todo ello, parece que las nuevas mitocondrias generadas adquieren un potencial de membrana

mitocondrial adecuado y a pesar del mayor número de mitocondrias no se altera la producción de ERO celular.

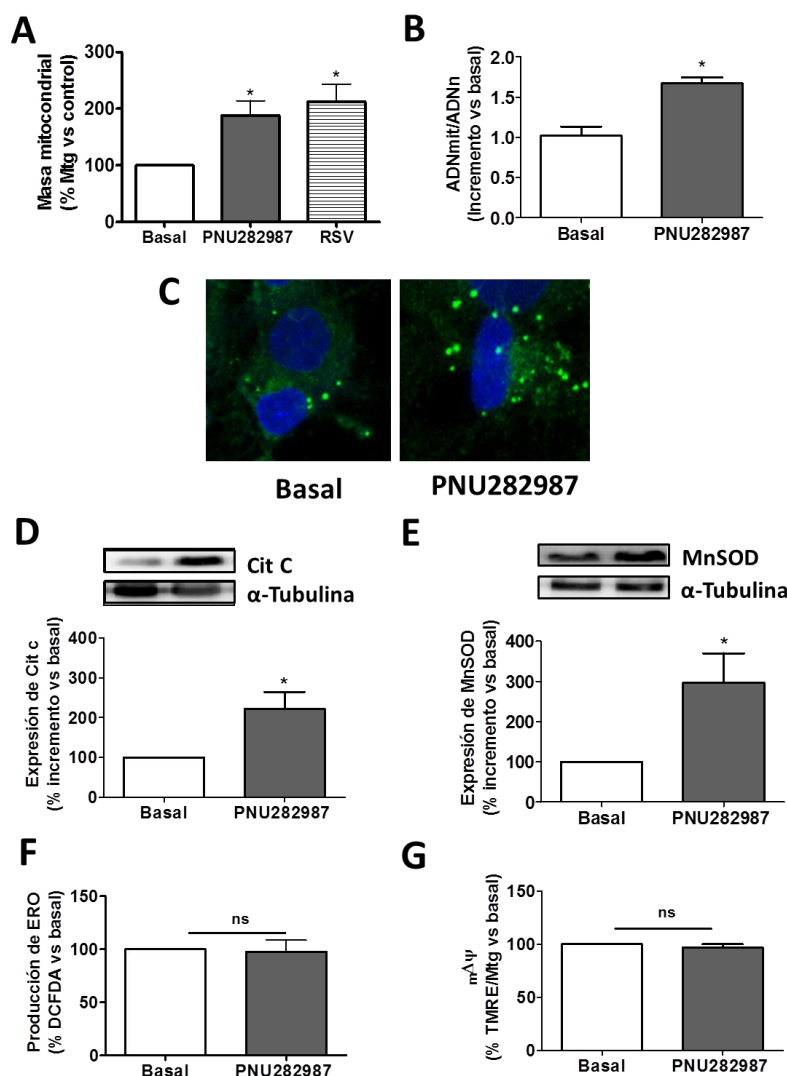


Figura 16. La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial en las células de glía. (A) Cuantificación de la masa mitocondrial a través de la fluorescencia de Mtg por citometría de flujo empleando 10 μ M de Resveratrol como control positivo. Se muestra la media \pm e.e.m. de 5 cultivos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal. (B) Medida del ratio ADNmit/ADNn por PCR. Se muestra la media \pm e.e.m. de 5-6 medidas de 2 cultivos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal. (C) Imágenes representativas de la fluorescencia de Mtg tomadas mediante microscopio confocal con un objetivo de 63X. Expresión de las proteínas mitocondriales Citocromo c (D) y MnSOD (E). Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 8-9 cultivos independientes * $p < 0,05$ vs Basal. Cuantificación de la producción de ERO (H_2DCFDA) (F) y del potencial de membrana mitocondrial (ratio TMRE/Mtg) (G) mediante citometría de flujo. Se muestra la media \pm e.e.m. de 4 cultivos independientes.

5.2.2. El PNU282987 incrementa la tasa de consumo de oxígeno en células de glía

Una vez determinado que el tratamiento con el PNU282987 producía un incremento en la masa mitocondrial, quisimos comprobar que las nuevas mitocondrias generadas eran funcionales. Para ello, estudiamos la Tasa de Consumo de Oxígeno (TCO) mediante el *Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse), tal y como se describe en Materiales y Métodos sección 4.2.6.

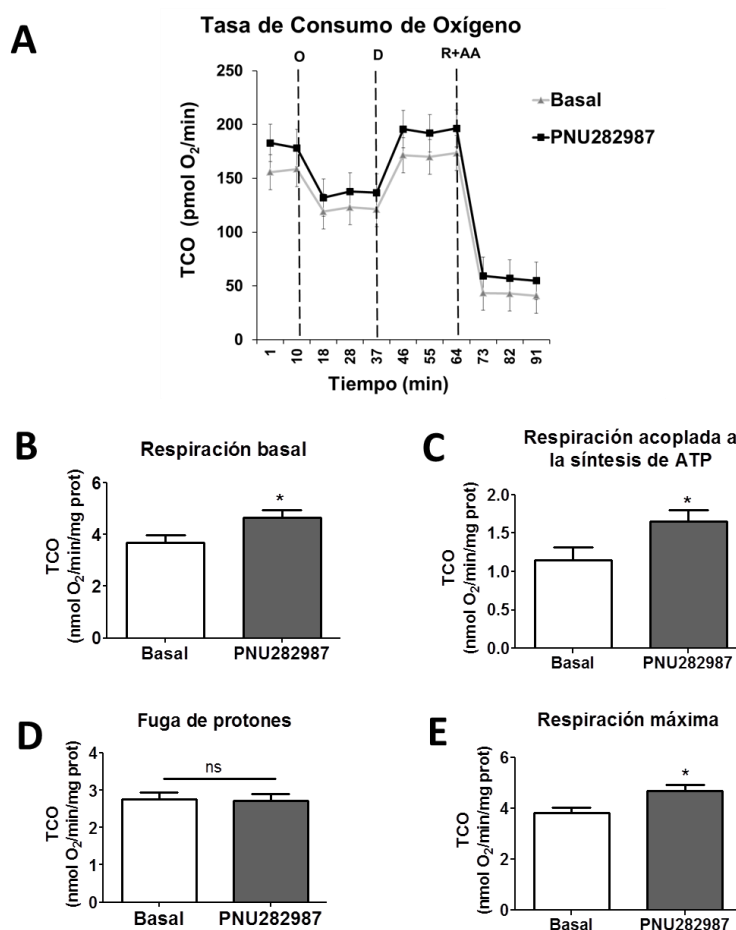


Figura 17. La activación del $\alpha 7$ nAChR produce un incremento en la respiración mitocondrial. Se midió la tasa de consumo de oxígeno (TCO) a través del Seahorse en células tratadas con vehículo o 10 μ M PNU282987 durante 48 h. **(A)** Diagrama representativo de la TCO frente al tiempo. Cuantificación de la respiración Basal **(B)**, Respiración acoplada a la síntesis de ATP **(C)**, Fuga de protones **(D)** y Respiración Máxima **(E)**. Para la cuantificación, la respiración no mitocondrial (R + AA) fue sustraída a todos los valores y fueron corregidos por la cantidad de proteína. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal.

El perfil respiratorio de las células tanto en situación basal como tratadas con el PNU282987 puede observarse en la **Figura 17A**. Cuando se analizaron los distintos parámetros respiratorios se observó que el tratamiento con el PNU282987 producía un incremento significativo no solo en la respiración basal (**Fig. 17B**), sino también en la respiración acoplada a la síntesis de ATP (**Fig. 17C**) y en la respiración máxima (**Fig. 17E**). Sin embargo, no se observaron diferencias en la fuga de protones (**Fig. 17D**). Estos resultados ponen de manifiesto que las nuevas mitocondrias generadas son funcionales y, por tanto, que el empleo de agonistas $\alpha 7$ nAChR puede ser una estrategia interesante para incrementar la bioenergética mitocondrial.

5.2.3. El efecto mitocondriogénico del PNU282987 es dependiente de la vía de señalización Nrf2/HO-1

Tal y como se ha mostrado en el objetivo 1 de la presente Tesis Doctoral, la activación del $\alpha 7$ nAChR produce la inducción de la enzima HO-1 por un mecanismo dependiente de Nrf2 en cultivo organotípico de hipocampo de rata; dicha inducción también se corroboró en el presente modelo de trabajo (cultivo primario de glía) (**Fig. 18B**). Teniendo en cuenta que existen datos en la bibliografía que demuestran que la HO-1 estaría implicada en el proceso de biogénesis mitocondrial (Piantadosi et al., 2008), quisimos estudiar la implicación del eje Nrf2/HO-1 en el efecto mitocondriogénico activado por el PNU282987.

En primer lugar, obtuvimos cultivos primarios gliales de ratones WT y ratones Nrf2^{-/-}, los cuales se trataron con PNU282987 durante 48 h y, posteriormente, se estudió la masa mitocondrial por citometría de flujo. Como se puede observar en la **Figura 18A**, el incremento en la masa mitocondrial producido en la glia de los animales WT se vio abolido en los ratones Nrf2^{-/-}, indicando la implicación de dicho factor de transcripción en este proceso.

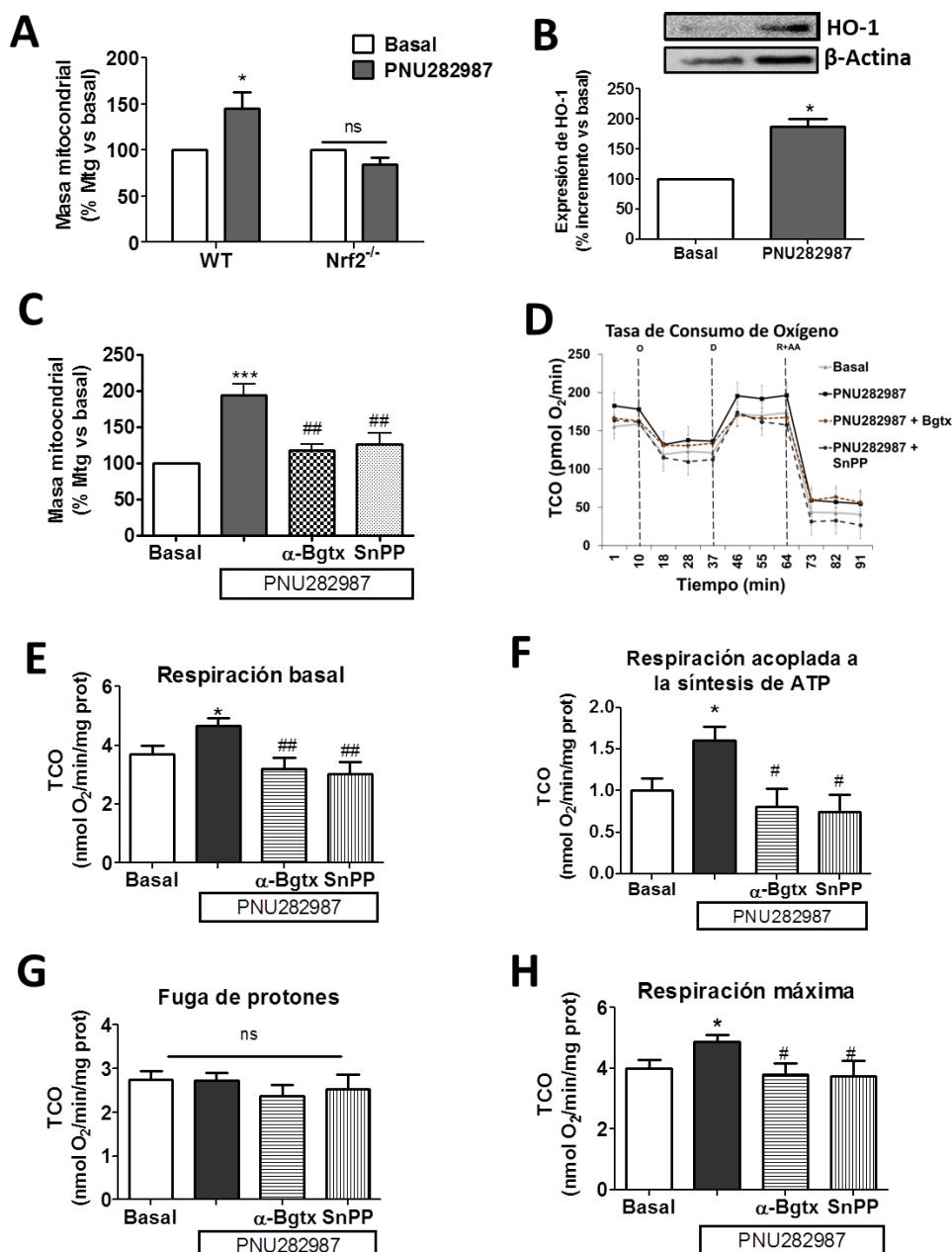


Figura 18. El efecto del PNU282987 sobre la biogénesis mitocondrial es bloqueado por la α -Bgtx y es dependiente de la vía de señalización Nrf2/HO-1. (A) Cuantificación de la masa mitocondrial mediante Mtg en cultivos WT y Nrf2^{-/-}. Se muestra la media \pm e.e.m. de 8-9 experimentos. * $p < 0,05$ vs Basal. (B) Expresión de HO-1 medido por Western-blot. Se muestra la media \pm e.e.m. de 3 cultivos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal. (C) El efecto mitocondriogénico del PNU282987 es bloqueado tanto por la α -Bgtx (100 nM) como por la SnPP (3 μ M). El gráfico muestra la media \pm e.e.m. de 4 cultivos independientes. *** $p < 0,001$ vs Basal; # $p < 0,01$ vs PNU282987. (D) Diagrama de la TCO frente al tiempo con los distintos tratamientos. Cuantificación de la Respiración Basal (E), Respiración acoplada a la síntesis de ATP (F), Fuga de Protones (G), Respiración Máxima (H). La respiración no mitocondrial fue sustraída y los datos fueron corregidos por la cantidad de proteína. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs PNU282987.

De cara a estudiar si la enzima HO-1 podría estar implicada, empleamos el inhibidor farmacológico de la misma, la SnPP. Paralelamente, también empleamos la α -Bgtx de cara a estudiar si los efectos observados eran específicos del $\alpha 7$ nAChR. Cuando se midió la masa mitocondrial por citometría de flujo se observó que el efecto del PNU282987 se suprimía tanto en presencia de α -Bgtx como SnPP (**Fig. 18C**). Estos resultados a nivel de masa mitocondrial fueron corroborados mediante el Seahorse (**Fig. 18D**), observándose que el incremento en la respiración basal, respiración acoplada a la síntesis de ATP y respiración máxima eran prevenidos tanto cuando el $\alpha 7$ nAChR estaba bloqueado como cuando la enzima HO-1 estaba inhibida (**Fig. 18E-G**); sin observarse, una vez más, alteraciones a nivel de la fuga de protones (**Fig. 8H**). Estos datos demuestran de manera fehaciente que la activación del $\alpha 7$ nAChR conduce a un incremento en la masa mitocondrial a través de un mecanismo que implica el eje Nrf2/HO-1.

5.2.4. La activación de PGC-1 α , vía Nrf2, es necesaria para el incremento en masa mitocondrial promovida por la activación $\alpha 7$ nAChR

Como se ha presentado en la Introducción, numerosas cascadas de señalización conducen a la activación de la biogénesis mitocondrial, convergiendo en la activación del factor de transcripción PGC-1 α , también llamado “regulador maestro de la biogénesis mitocondrial”. Es por ello que consideramos de importancia estudiar la potencial implicación de PGC-1 α en este estudio.

En primer lugar, se observó que la activación del $\alpha 7$ nAChR conducía a un incremento en la expresión de dicho factor de transcripción por Western blot (**Fig. 19A**). De cara a estudiar la implicación del mismo, se silenció su expresión mediante el empleo de shPGC-1 α (a través de un vector adenoviral) y la eficacia del silenciamiento fue determinada mediante Western blot (**Fig. 19B**). A pesar de que el PNU282987 produjo un incremento en la masa mitocondrial en las células infectadas con adenovirus control, en las células en las cuales PGC-1 α no se expresaba el PNU282987 fue incapaz de producir un incremento en la masa mitocondrial (**Fig. 19B**), demostrando la relevancia de este co-factor transcripcional en el proceso mitocondriogénico activado por el PNU282987.

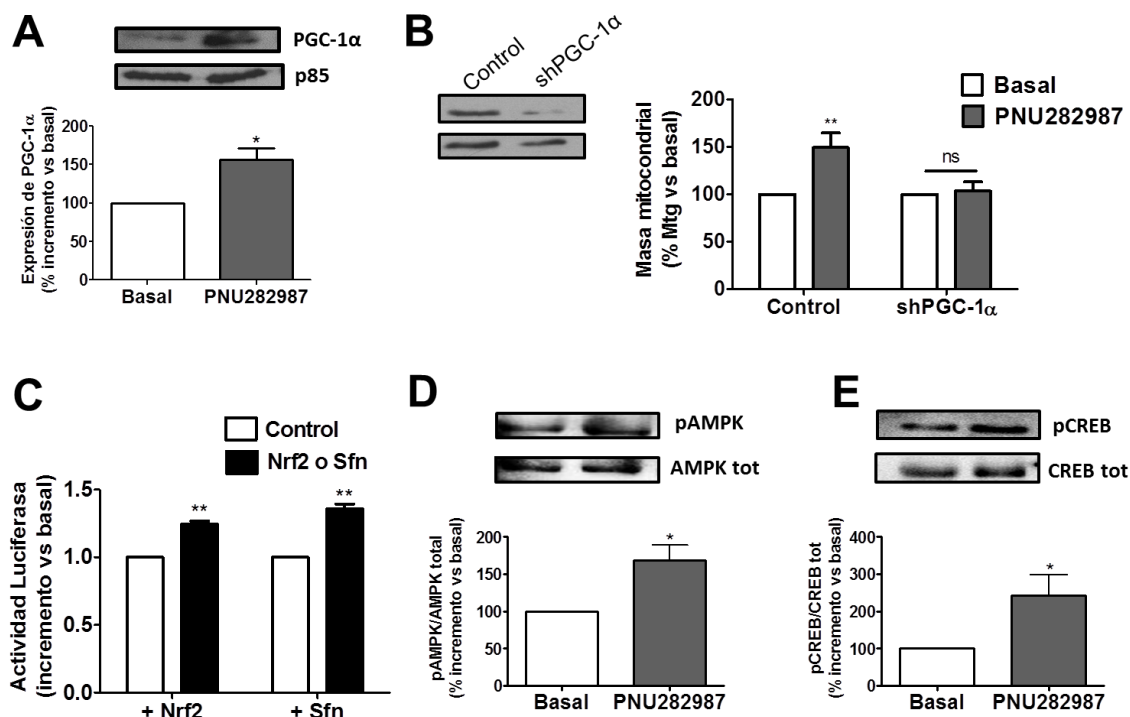


Figura 19. El PNU282987 activa la biogénesis mitocondrial vía PGC-1α. (A) El tratamiento con PNU282987 incrementa la expresión de PGC-1α medido por Western-blot. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m. de 4 experimentos independientes. (B) El silenciamiento de PGC-1α previene del efecto mitocondriogénico del PNU282987. En el panel de la izquierda se muestra un Western blot representativo de la eficacia del silenciamiento y en el panel de la derecha se muestra la cuantificación de la masa mitocondrial medido mediante Mtg por citometría de flujo. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m. de 5 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ vs Basal. (C) Nrf2 produce un incremento en la actividad del promotor de PGC-α. Células MEF fueron transfectadas con el promotor de PGC-1α unido al gen reportero de la luciferasa y fueron o co-transfectadas con el plásmido de Nrf2 o tratadas con 10 μ M Sfn. Los datos muestran la media \pm e.e.m. de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. ** $p < 0,01$ vs Control. El tratamiento con el PNU282987 incrementa la fosforilación de las proteínas AMPK (D) y CREB (E) medido por Western blot. Los gráficos corresponden a la media \pm e.e.m. de 4-6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs Basal.

Existen evidencias en la literatura que indicarían de manera indirecta que la expresión de PGC-1α podría estar regulada vía Nrf2 (Fernandes et al., 2015), aunque dicha relación no haya sido demostrada de manera fehaciente. Con este objetivo en mente, se transfectaron células MEF con el promotor de PGC-1α unido al gen reportero de la luciferasa, de modo que incrementos en su expresión pudiesen ser medidos mediante luminiscencia. Paralelamente, las células se transfectaron con un plásmido que codificaba para Nrf2 o se trataron con el inductor de Nrf2 sulforafano (Sfn) 10 μ M. En ambos casos, tanto la

transfección directa con Nrf2 como su activación mediante el empleo de Sfn, produjo un incremento en los niveles de luminiscencia en comparación con la variable control (**Fig. 19C**), indicando que existe regulación en la expresión de PGC-1 α a través de Nrf2.

Adicionalmente, también se observó que el tratamiento con PNU282987 producía un incremento en la fosforilación, y por tanto activación, tanto de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) (**Fig. 19D**) como del factor transcripcional CREB (**Fig. 19E**). AMPK incrementa la actividad de PGC-1 α mediante la fosforilación del mismo y CREB induce su expresión al unirse a su promotor, por lo tanto, estos resultados indican que estas vías también podrían estar implicadas en el mecanismo que conduce a la activación de PGC-1 α en este modelo. En cualquier caso, con estos resultados se demuestra que la activación del $\alpha 7$ nAChR conduce a un incremento en la expresión de PGC-1 α , el cual también está implicado en los efectos mitocondriogénicos mediados por el PNU282987.

5.2.5. La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial *in vivo* vía HO-1 y PGC-1 α

Llegados a este punto, hemos demostrado cómo la activación del $\alpha 7$ nAChR en células gliales conduce a una inducción en la expresión de HO-1 y PGC-1 α , a través de las cuales activa la biogénesis mitocondrial. De cara a afianzar estos resultados y estudiar su implicación fisiológica, decidimos estudiar si esta vía de señalización se reproducía en un modelo *in vivo*. Para ello, se trataron ratones C57bl/6 con el agonista nicotínico $\alpha 7$ PNU282987 a la dosis de 10 mg/kg vía i.p. cada 12 h durante 48 h (**Fig. 20A**). Transcurrido el tratamiento, se procedió a aislar la microglía mediante gradiente de Percoll para estudiar específicamente en dicha población los cambios en masa mitocondrial mediante citometría de flujo con la sonda Mtg. Se comprobó la pureza de la población aislada mediante el empleo de diferentes anticuerpos por citometría de flujo. Así, se observó que la población era CD11b⁺ (marcador de microglía), GLAST1⁻ (marcador de astrocitos) y que presentaba bajos niveles de CD45 (marcador de macrófagos), consiguiendo niveles de pureza de alrededor del 82 % (calculado como el % de células CD11b⁺ frente al total de eventos) (**Fig. 20B**). Independientemente de los niveles de pureza, en los experimentos posteriores únicamente se analizaron los niveles de Mtg en las células CD11b⁺, por lo tanto, en la microglía.

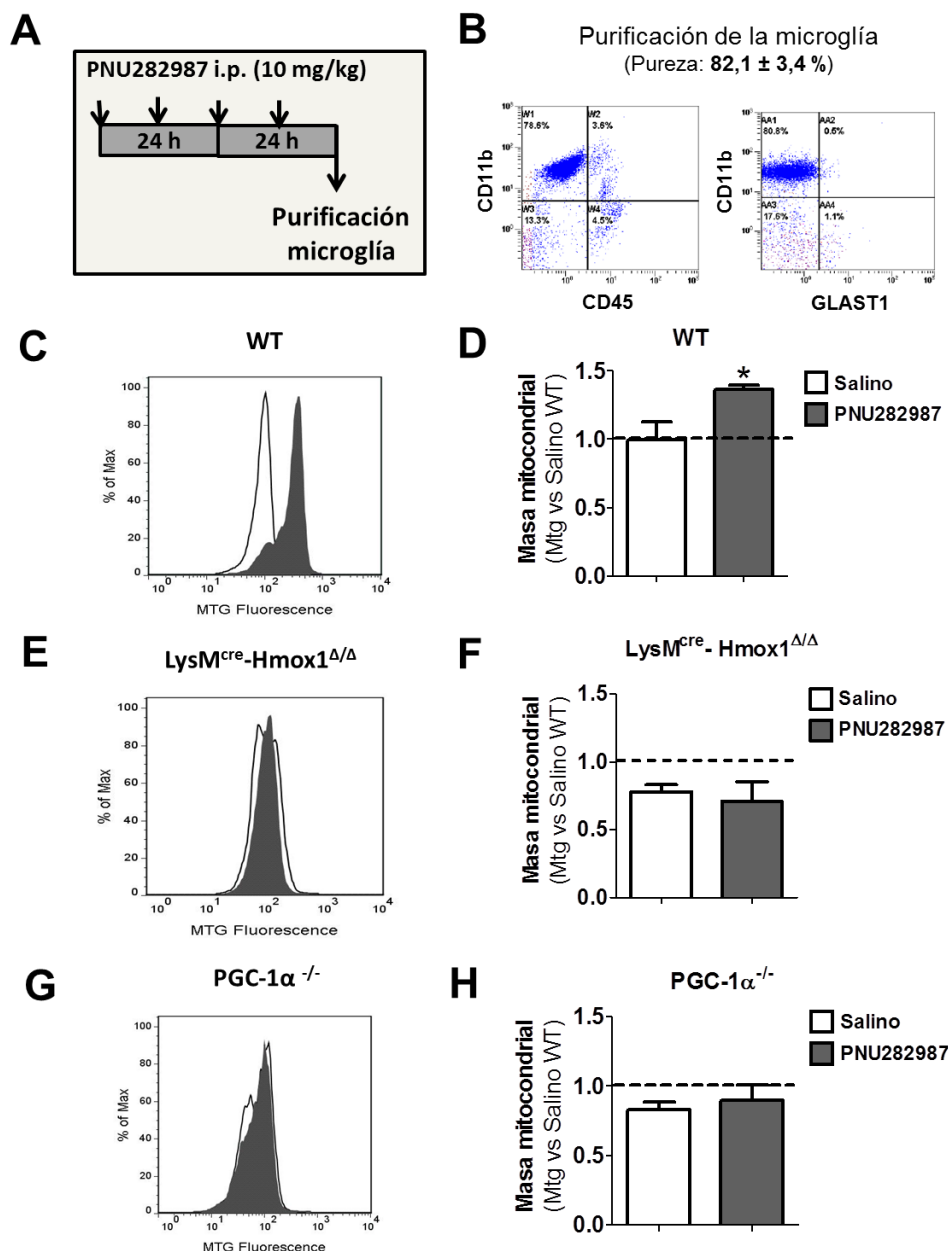


Figura 20. Dosis repetidas de PNU282987 (10 mg/kg) via i.p. incrementan la masa mitocondrial *in vivo* específicamente en la microglía mediante un mecanismo HO-1 y PGC1α dependiente. (A) Protocolo experimental. (B) La pureza de la población microglial se analizó por citometría de flujo empleando los marcadores CD11b, CD45 y GLAST. Diagramas representativos de la fluorescencia de Mtg en células CD11b⁺ de animales WT (C), LysM^{Cre}-Hmox1^{Δ/Δ} (E) y PGC-1α^{-/-} (G) tratados con salino o PNU282987. Cuantificación de la fluorescencia de Mtg en las células CD11b⁺ animales WT (D), LysM^{Cre}-Hmox1^{Δ/Δ} (F) y PGC-1α^{-/-} (H) tratados con salino o PNU282987. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m. de 8 WT Salino, 6 WT PNU282987, 6 LysM^{Cre}-Hmox1^{Δ/Δ}/grupo y 4 PGC-1α^{-/-}/grupo.

Cuando se trataron animales WT con el PNU282987 durante 48 h y se analizaron los niveles de Mtg en la población microglial, se observó que en los animales tratados con el agonista $\alpha 7$ se producía un incremento significativo en la masa mitocondrial en comparación con los salinos (**Fig. 20C, 20D**) (Salino: 1.0 ± 0.09 vs PNU282987: 1.3 ± 0.08). De esta manera, corroboramos que la activación $\alpha 7$ nAChR promueve un incremento en la biogénesis mitocondrial no sólo *in vitro* sino también *in vivo*.

Adicionalmente, se realizó el mismo experimento en animales $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{-Hmox1}^{\Delta/\Delta}$, caracterizados por no expresar la enzima HO-1 específicamente en la línea mieloide (macrófagos y microglía, entre otros). Los resultados de fluorescencia del Mtg se normalizaron frente los niveles de fluorescencia de los animales WT tratados con salino (de manera intra-experimento). Con este experimento pudimos comprobar dos cosas interesantes. Por un lado, resulta remarcable el hecho de que los animales $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{-Hmox1}^{\Delta/\Delta}$ salinos presenten niveles inferiores de contenido mitocondrial en comparación con sus WT (WT Salino: 1.0 ± 0.08 vs $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{-Hmox1}^{\Delta/\Delta}$ Salino: 0.78 ± 0.057). Adicionalmente, el tratamiento con el PNU282987 no produjo un incremento en la masa mitocondrial ($\text{LysM}^{\text{cre}}\text{-Hmox1}^{\Delta/\Delta}$ Salino: 0.78 ± 0.056 vs PNU282987: 0.71 ± 0.16), corroborando así los resultados *in vitro* (**Fig. 20E, 20F**).

Finalmente, se procedió a realizar el mismo experimento con animales $\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$. De manera similar a los observado anteriormente, los animales $\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$ presentaron, por un lado un menor contenido mitocondrial de manera basal en la población microglial (WT Salino: 1.0 ± 0.04 vs $\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$ Salino: 0.83 ± 0.063), y, el tratamiento con el PNU282987 no tuvo ningún efecto a nivel de masa mitocondrial ($\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$ Salino: 0.83 ± 0.063 vs $\text{PGC-1}\alpha^{-/-}$ PNU282987: 0.89 ± 0.13) (**Fig. 20G, 20H**).

Con todo ello, hemos podido trasladar las observaciones realizadas *in vitro* a un modelo *in vivo*, demostrando que las inyecciones repetidas de PNU282987 durante 48 h conducen a un incremento en la masa mitocondrial en la microglía, y este efecto ocurre vía activación de HO-1 y $\text{PGC-1}\alpha$.

5.3. Objetivo 3

La activación central del $\alpha 7$ nAChR atenúa la neuro-inflamación inducida por LPS en animales adultos pero no en envejecidos

Resumen

Los resultados derivados de este objetivo describen cómo la activación de los $\alpha 7$ nAChRs centrales revierte el daño inflamatorio causado por LPS una vez instaurado; sin embargo, estos efectos no se mantienen cuando la administración es periférica, poniendo de manifiesto la importancia de la regulación de la microglía para el control de la neuro-inflamación. También reportamos cómo los efectos anti-neuroinflamatorios de los $\alpha 7$ nAChRs centrales observados en los animales adultos se pierden en el envejecimiento. Así, aunque se demuestra la existencia de la *Vía colinérgica anti-inflamatoria* a nivel de SNC, observamos como la capacidad de regular el fenotipo microglial via $\alpha 7$ nAChRs se pierde con el envejecimiento.

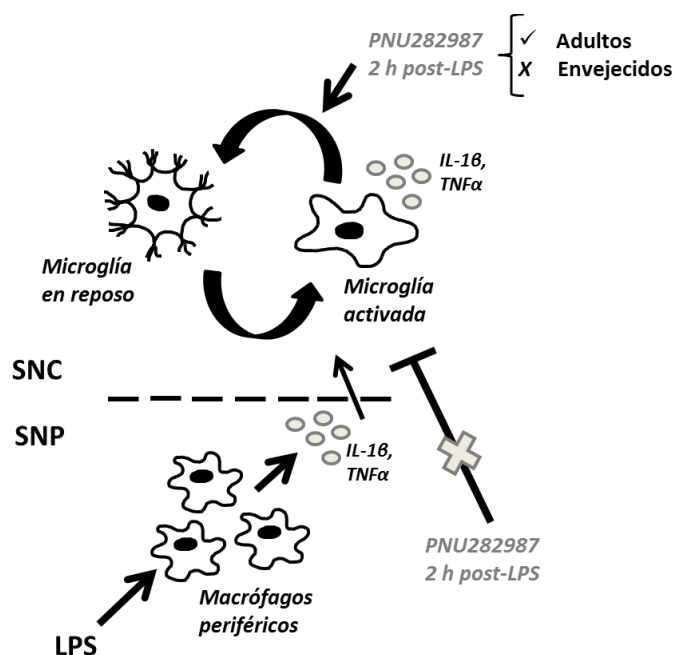


Figura 21. Resumen gráfico de los resultados relativos al Objetivo 3. La activación central de los $\alpha 7$ nAChRs tiene un efecto anti-neuroinflamatorio en animales jóvenes pero no en envejecidos.

5.3.1. La activación del $\alpha 7$ nAChR atenúa las alteraciones comportamentales derivadas del tratamiento con LPS

Una vez determinados los efectos mitocondriales derivados de la activación del $\alpha 7$ nAChR en cultivos gliales y dada la relación entre la biogénesis mitocondrial y el control de la respuesta inflamatoria, quisimos estudiar los efectos del PNU282987 en un modelo puramente inflamatorio. Para ello, decidimos emplear un modelo *in vivo* de neuro-inflamación producido por LPS. El modelo de inflamación empleado consistió en la inyección i.p. de 0,33 mg/kg de LPS a animales BALB/c lo cual conduce a una respuesta neuro-inflamatoria transitoria caracterizada por pérdida de peso, alteraciones comportamentales (disminución de la interacción social y de la actividad locomotora) e incremento en la expresión de citocinas inflamatorias tanto a nivel periférico como central (Norden et al., 2015). Empleando este modelo de estudio, quisimos estudiar si la *Vía Colinérgica anti-inflamatoria* descrita en SNP para el $\alpha 7$ nAChR podía trasladarse a nivel de SNC. Para ello, inyectamos de manera paralela al LPS, 10 mg/kg de PNU282987 también i.p., y evaluamos la pérdida de peso y las alteraciones comportamentales a distintos tiempos post-LPS (0, 4, 8 y 24 h) (**Fig. 22A**). Como puede observarse en la **Figura 22B**, los animales inyectados con LPS sufren una pérdida de peso progresiva a los diferentes tiempo evaluados, alcanzándose niveles cercanos al 10 % de pérdida de peso corporal a las 24 h. La pérdida de peso se vio atenuada en aquellos animales tratados con PNU282987, siendo significativamente inferior al grupo LPS a las 24 h. En cuanto a las pruebas comportamentales (**Fig. 22C, 22D**), la respuesta inflamatoria derivada del LPS hace que los animales muestren una disminuida interacción social y locomoción, especialmente en las primeras horas (4 y 8 h), recuperándose a las 24 h; en los animales tratados con PNU282987, la caída de los valores, tanto en el test de interacción social como en el test de locomoción, se vio atenuada aunque no se obtuvieron diferencias significativas.

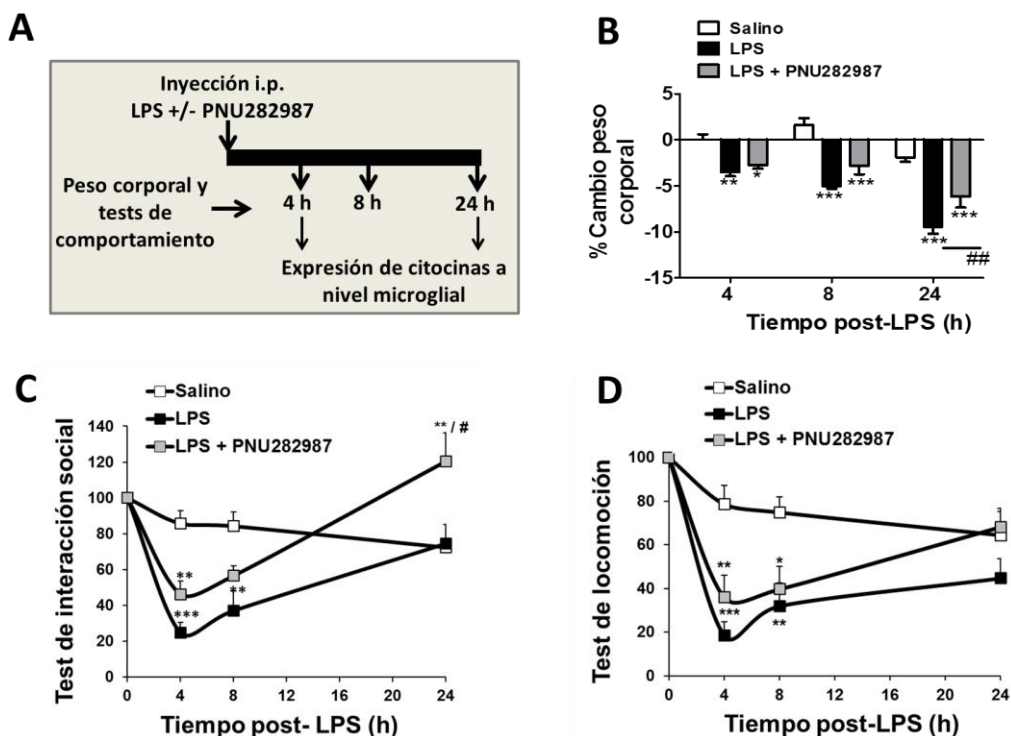


Figura 22. La inyección i.p. de PNU282987 atenúa las alteraciones comportamentales derivadas del LPS en animales adultos. Animales Balb/c de 3-4 meses de edad fueron inyectados i.p. con 0.33 mg/kg de LPS y 10 mg/kg de PNU282987. (A) Diseño experimental del protocolo. A las 4, 8 y 24 h post-LPS se evaluaron el cambio en el peso corporal (%) (B), el test de interacción social (C) y el test de locomoción (D). Los datos corresponden a la media \pm e.e.m. de 8 animales/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Salino; ## $p < 0,01$ vs LPS.

5.3.2. La activación del $\alpha 7$ nAChR reduce la activación microglial derivada del tratamiento con LPS

Este modelo de inflamación transitoria se caracteriza por una respuesta inflamatoria aguda durante las primeras horas (2 y 4 h post-LPS) en las cuales hay un incremento muy elevado en la expresión de citocinas pro-inflamatorias. 24 h post-LPS los animales están prácticamente recuperados de las alteraciones comportamentales, aunque algunas de las citocinas siguen manteniéndose elevadas (Norden et al., 2015). Siguiendo los protocolos descritos en las **Figuras 22A y 23A**, se analizó la expresión de citocinas a dos tiempos distintos, 4 h (fase de inflamación aguda) y 24 h (fase de resolución de la inflamación). Para estudiar los efectos específicamente en la población microglial, se aislaron estas células mediante gradiente de Percoll y se analizó la expresión de citocinas por qPCR. El

tratamiento con el PNU282987 produjo una reducción en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF α e iNOS (**Fig. 23B-D**). 24 tras la inyección de LPS también se observó una reducción en la expresión del mensajero de IL-1 β y una tendencia a reducir TNF α en los animales tratados con el agonista nicotínico (en el caso de la enzima iNOS no se observó incremento a este tiempo con el LPS). Finalmente, a pesar de la abundante literatura que demuestra los efectos anti-inflamatorios del $\alpha 7$ nAChR a nivel de SNP (Wang et al., 2003), no se observaron reducciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-6 en los animales tratados con el PNU282987 en ninguno de los tiempos post-LPS estudiados.

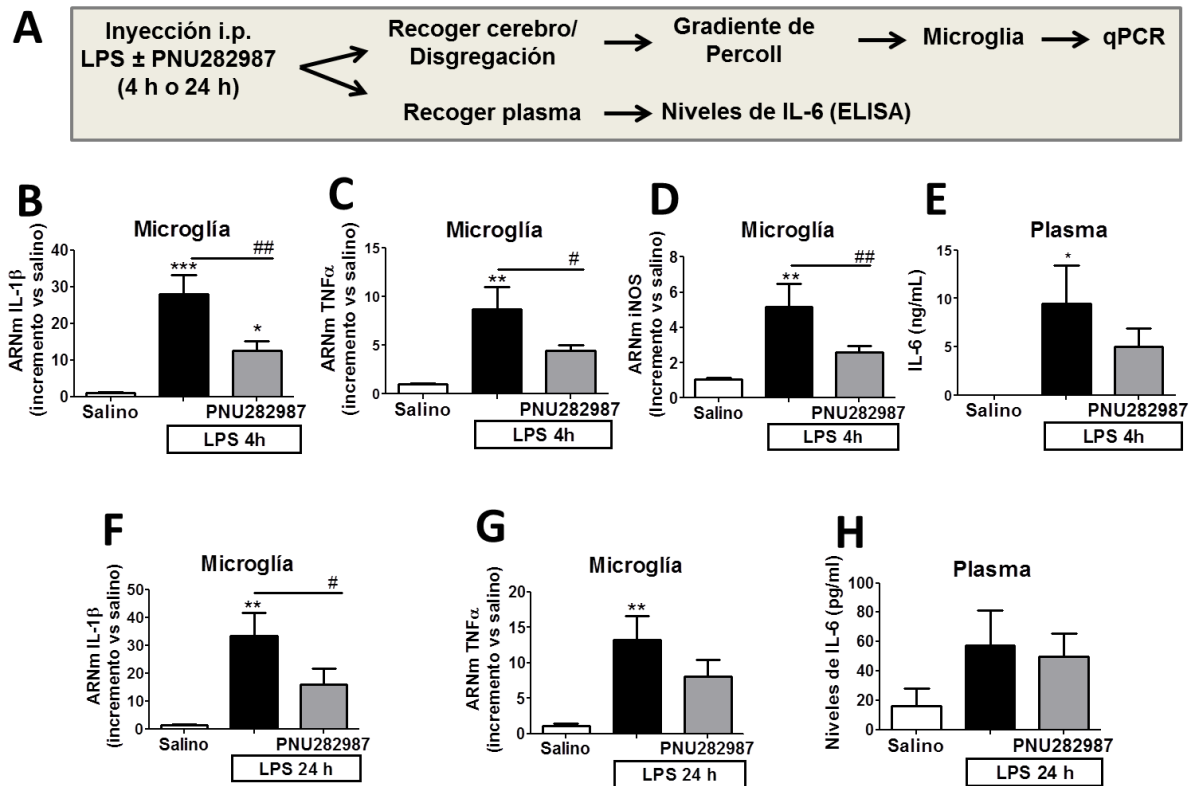


Figura 23. La activación del $\alpha 7$ nAChR previene la producción de citocinas pro-inflamatorias en la microglía. (A) Esquema representativo del protocolo experimental. Los animales fueron tratados i.p. con LPS 0,33 mg/kg \pm PNU282987 10 mg/kg, se sacrificaron a las 4 y 24 h post-LPS y se analizó la expresión de citocinas pro-inflamatorias en la microglía y en plasma. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión en la microglía del ARNm de IL-1 β (B), TNF- α (C) e iNOS (D) 4 h tras la inyección de LPS \pm PNU282987. (E) Niveles plasmáticos de IL-6 medidos mediante ELISA 4 post-LPS. Medida mediante qPCR de los niveles de expresión del ARNm en la microglía de IL-1 β (F) y TNF- α (G) 24 h post-LPS. Niveles plasmáticos de IL-6 medidos mediante ELISA. Los gráficos representan la media \pm e.e.m. de 8 animales/grupo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs Salino. # p <0,05, ## p <0,01 vs LPS.

Debido a la alta variabilidad obtenida con las muestras de microglía, decidimos corroborar los resultados en cortes coronales de cerebro. Aunque el PNU282987 había reducido significativamente la producción de citocinas pro-inflamatorias en la microglía, cuando se analizaron las rodajas de cerebro únicamente se obtuvo una reducción significativa en el ARNm de IL-1 β (**Fig. 24A-C**), resultados que se podrían explicar por el hecho de que al analizar el cerebro completo, el efecto sobre citocinas pro-inflamatorias microgliales queda diluido. Sin embargo, cabe destacar que el PNU282987 redujo significativamente la producción de IL-1 β y TNF- α (**Fig. 24D, 24E**). Adicionalmente, se midieron los niveles de expresión del ARNm de los marcadores anti-inflamatorios IL-10 e IL-4R, sin encontrar diferencias significativas entre las variables LPS y LPS + PNU282987 (**Fig. 24F, 24G**).

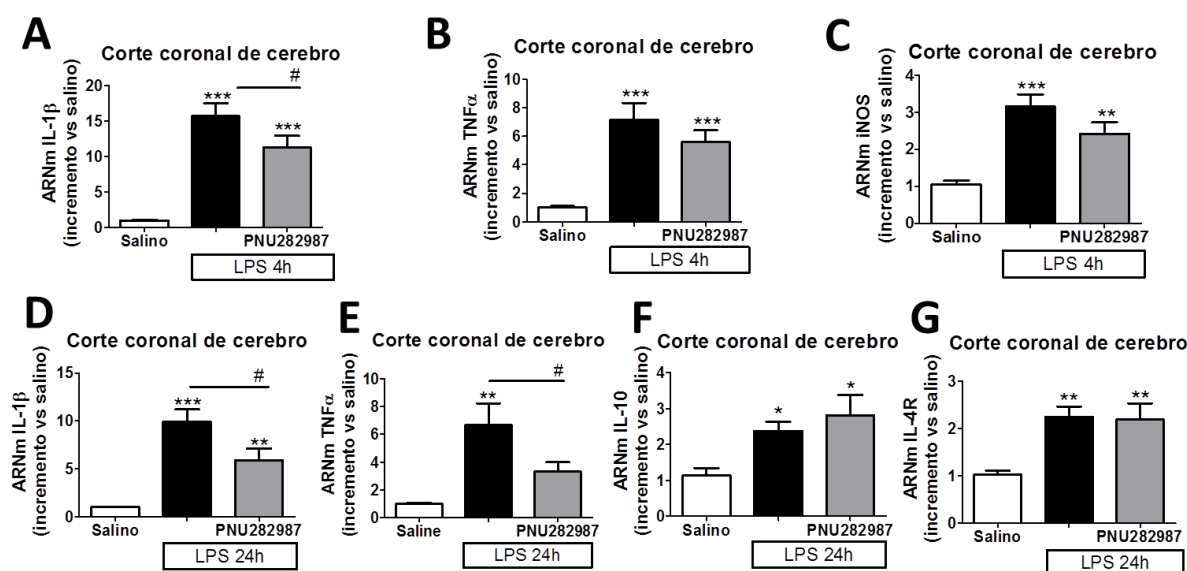


Figura 24. La activación del $\alpha 7$ nAChR previene la producción de citocinas pro-inflamatorias en muestras de cerebro. Niveles de ARNm medido por qPCR de IL-1 β (A), TNF- α (B) e iNOS (C) a las 4 h post-LPS. Niveles de ARNm medido por qPCR de IL-1 β (D), TNF- α (E), IL-10 (F) y IL-4R (G) a las 24 h post-LPS. Los gráficos representan la media \pm e.e.m. de 8 animales/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Salino. # $p < 0,05$ vs LPS.

De esta manera, demostramos como la activación del $\alpha 7$ nAChR tiene un efecto anti-inflamatorio a nivel microglial, lo cual nos llevó a estudiar los efectos de la activación central de dicho receptor.

5.3.3. La activación central del $\alpha 7$ nAChR 2 h post-LPS revierte las alteraciones comportamentales y la neuro-inflamación

Tal y como se ha planteado en el apartado anterior, los resultados obtenidos demuestran los efectos anti-inflamatorios del PNU282987, sin embargo no esclarecen si estos efectos son debidos a la activación periférica o central de los $\alpha 7$ nAChRs, puesto que el PNU282987 atraviesa la BHE (Wishka et al., 2006). Con este objetivo en mente, decidimos inyectar el PNU282987 i.c.v. para asegurar la activación únicamente de los $\alpha 7$ nAChR centrales. Además, decidimos inyectar dicho agonista $\alpha 7$ 2 h post-LPS para estudiar si el PNU282987 podía, más allá de prevenir el daño causado por el LPS, repararlo, ya que 2 tras la inyección ya se ha producido la respuesta neuro-inflamatoria y las alteraciones a nivel comportamental (Norden et al., 2015). De esta manera, se inyectaron 10 μ g de PNU282987 a través de una cánula i.c.v. y se siguió el protocolo experimental descrito en la **Figura 25A**. Aunque no se observaron diferencias ni a nivel de pérdida de peso ni a nivel del test de locomoción entre los animales tratados con el PNU282987 y los animales LPS (**Fig. 25B, 25D**), se observó una significativa recuperación en el test de interacción social en los animales tratados al tiempo de 8 h post-LPS (**Fig. 25C**). Posteriormente, los animales se sacrificaron a las 24 h y se analizó la expresión de citocinas a nivel microglial y plasmático. Se observó que el PNU282987 redujo la expresión de TNF α (**Fig. 25F**) y mostró una tendencia a reducir la expresión de IL-1 β (aunque no se observasen diferencias significativas) en la microglía (**Fig. 25E**). Cabe destacar, que estos resultados se confirmaron en cortes coronales de cerebro, en los cuales se observó que la expresión de ambas citocinas en los animales tratados con PNU282987 se encontraba significativamente reducida en comparación con los del grupo LPS (**Fig. 26A, 26B**). Como era de esperar, no se observó ningún efecto en los niveles de expresión de la citocina IL-6 (**Fig. 25G**). De esta manera, se demuestra que la activación central de los $\alpha 7$ nAChR es capaz de revertir parcialmente las alteraciones comportamentales y neuro-inflamatorias una vez que el daño inflamatorio se encuentra ya instaurado.

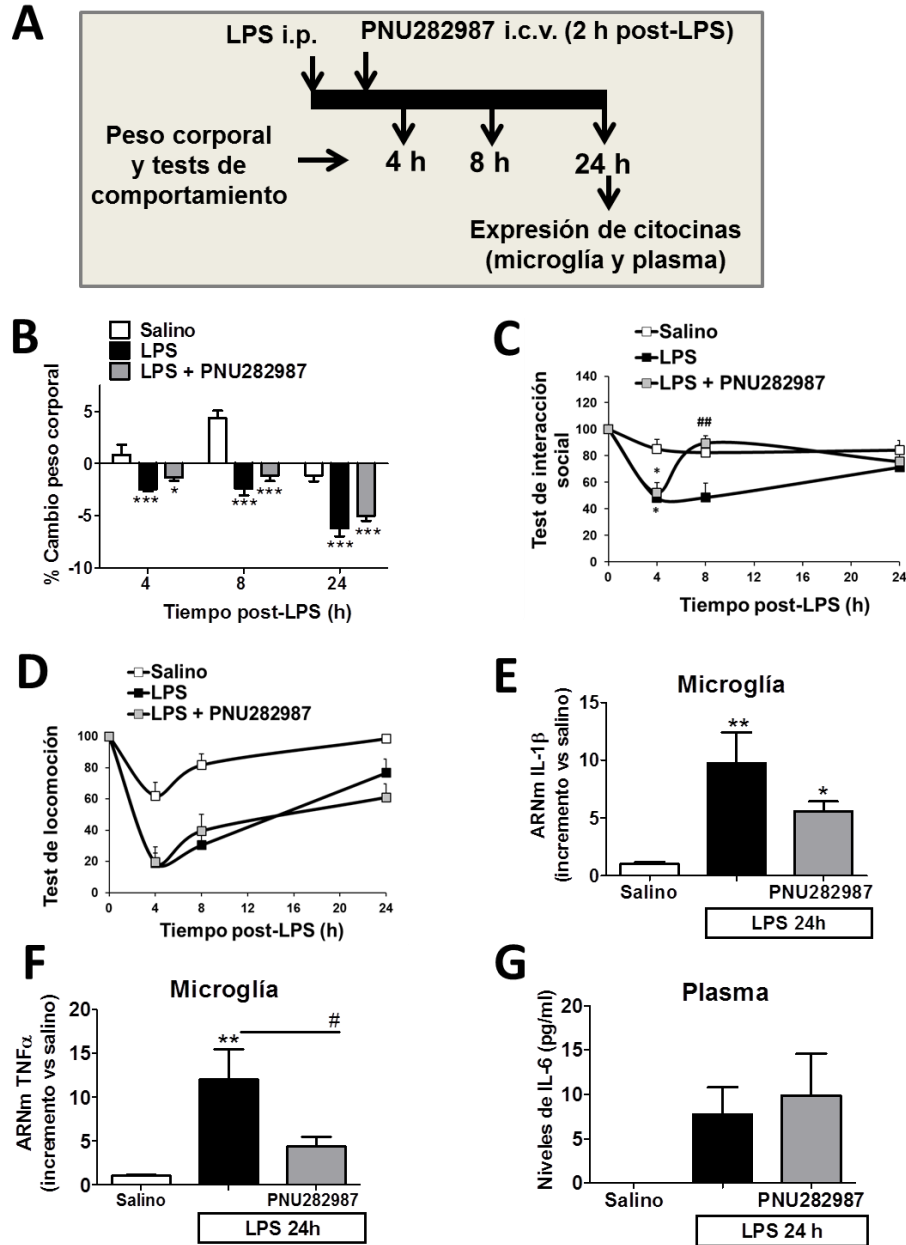


Figura 26. Efecto de la inyección i.c.v. del PNU282987 2 h post-LPS sobre las alteraciones comportamentales y la neuro-inflamación derivadas del tratamiento con LPS. Los animales fueron tratados con 0,33 mg/kg i.p. de LPS \pm 10 μ g i.c.v. de PNU282987 2 h post-LPS. (A) Esquema representativo del protocolo experimental. Se analizaron a las 4, 8 y 24 h post-LPS el cambio de peso corporal (B), el test de interacción social (C) y el test de locomoción (D). Niveles de expresión del ARNm por qPCR de IL-1 β (E) y TNF α (F) 24 h post-LPS. Niveles plasmáticos de IL-6 24 h post-LPS medidos mediante ELISA (G). Los gráficos representan la media \pm e.e.m. de 6-8 animales/grupo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs Salino. # p <0,05, ## p <0,01 vs LPS.

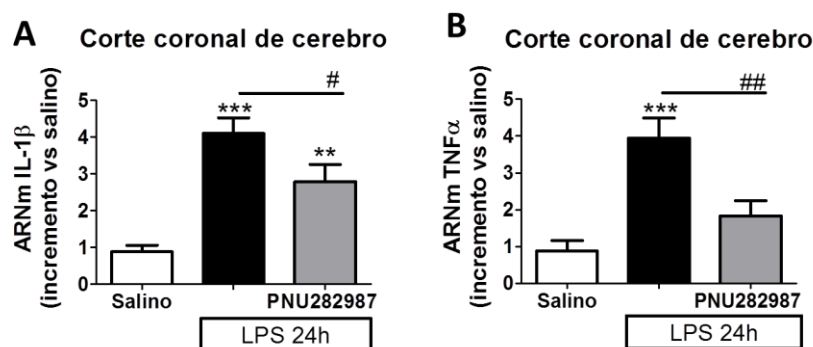


Figura 24. La activación central del $\alpha 7$ nAChR previene la producción de citocinas pro-inflamatorias en muestras de cerebro. Niveles de ARNm medido por qPCR de IL-1 β (A) y TNF- α (B). Los gráficos representan la media \pm e.e.m. de 6-8 animales/grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Salino. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs LPS.

5.3.4. La activación periférica de los $\alpha 7$ nAChR, 2 h post-LPS, no produjo mejoría ni a nivel comportamental ni a nivel de marcadores neuro-inflamatorios

Desde un punto de vista farmacológico es importante evaluar las propiedades de los compuestos administrándose de manera periférica y posterior a la instauración del daño, de cara a poder acercar los resultados a la práctica clínica. Por esta razón, el siguiente protocolo experimental consistió en la administración i.p. del PNU282987 2 post-LPS (**Fig. 27A**). Empleando esta aproximación experimental no se observó mejoría en ninguno de los parámetros evaluados: pérdida de peso (**Fig. 27B**), test de interacción social (**Fig. 27C**) y expresión microglial de IL-1 β (**Fig. 27D**) y TNF α (**Fig. 27E**). Estos resultados ponen de manifiesto que la administración periférica del PNU282987 no es capaz de revertir el daño inflamatorio cuando se aplica 2 h tras el estímulo LPS, reflejando que la ventana terapéutica en el presente modelo de toxicidad es inferior a 2 h.

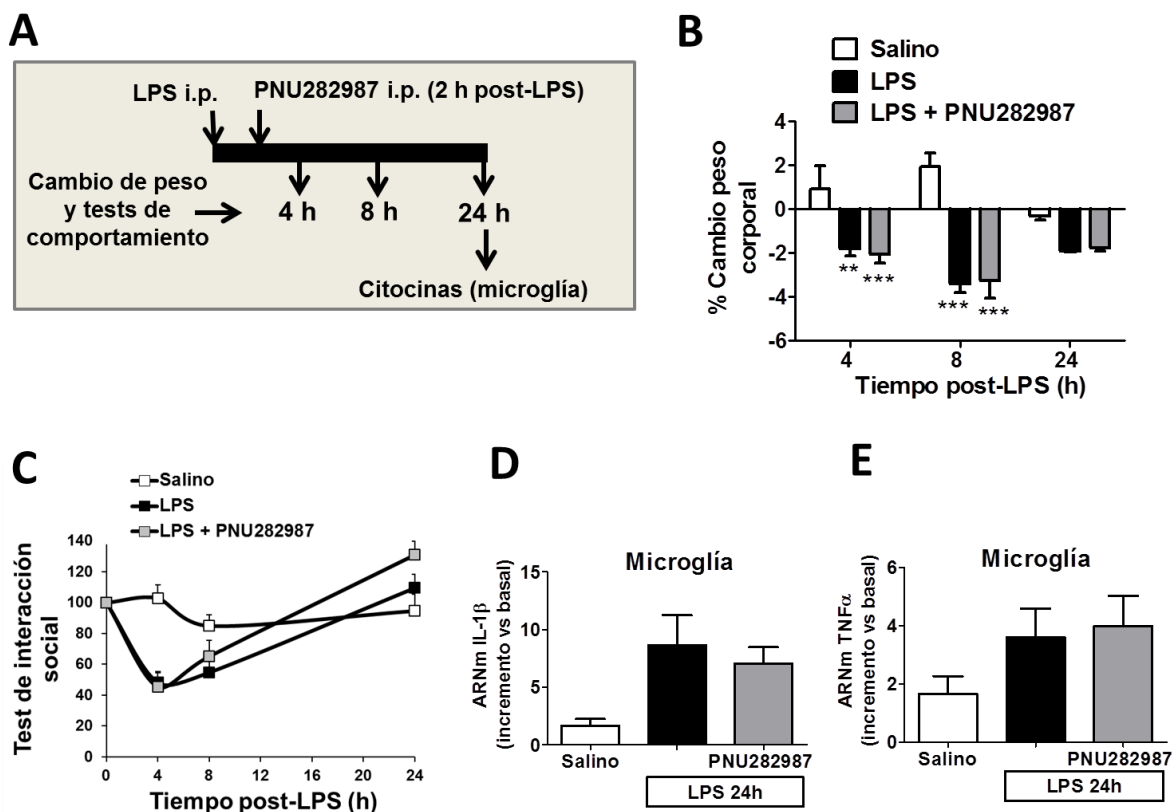


Figura 27. La administración i.p. de PNU282987 2 h post-LPS no previene las alteraciones comportamentales ni la neuro-inflamación derivadas del LPS. (A) Protocolo experimental: los animales fueron inyectados con 0,33 mg/kg LPS \pm 10 mg/kg PNU282987 2 h post-LPS. Cambio en el peso corporal (B) y test de interacción social (C) a las 4, 8 y 24 h post-LPS. Niveles de expresión del ARNm de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (D) y TNF α (E) 24 h post-LPS. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 4-6 animales/grupo. ** p <0,01, *** p <0,001 vs Salino.

5.3.5. Los efectos anti-neuroinflamatorios centrales del $\alpha 7$ nAChR se pierden durante el envejecimiento

Como se ha mostrado anteriormente, la administración central del $\alpha 7$ nAChR mostró propiedades anti-inflamatorias en animales adultos (3-4 meses de edad). Dado que la mayoría de las ENDs suelen estar asociadas al envejecimiento, decidimos trasladar dichos resultados a animales envejecidos (18-20 meses de edad). Se siguió el protocolo experimental previamente descrito en la **Figura 26A** consistente en la administración i.c.v. de 10 μ g de PNU282987 2 h post-LPS. Del mismo modo en que se describía en el apartado anterior, el PNU282987 no mostró ninguna mejoría ni a nivel de pérdida de peso (**Fig. 28A**), ni a nivel de test de interacción social (**Fig. 28B**) ni a nivel de expresión de las

citocinas IL-1 β y TNF α (Fig. 28C, 28D). De ahí, que estos resultados indiquen que los efectos anti-inflamatorios mediados via $\alpha 7$ nAChRs parecen estar mermados con el envejecimiento.

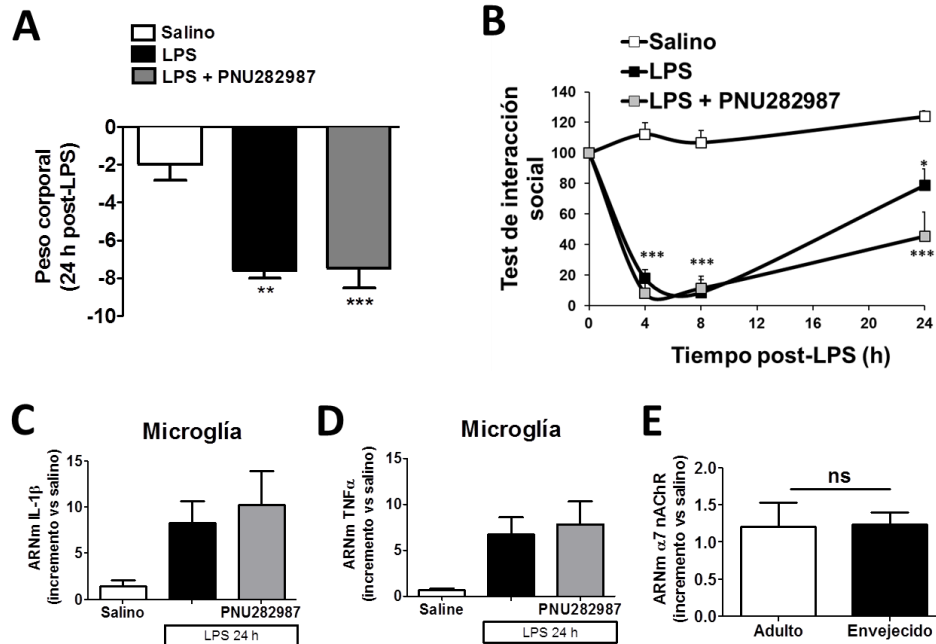


Figura 28. La activación central de los $\alpha 7$ nAChRs pierde su efecto anti-inflamatorio durante el envejecimiento. Animales de 18-20 meses de edad fueron inyectados con 0,33 mg/kg de LPS \pm 10 μ g PNU282987 2 h post-LPS. (A) Cambio en el peso corporal 24 h post-LPS. (B) Test de interacción social a las 4, 8 y 24 h post-LPS. Niveles de expresión del ARNm de las citocinas IL-1 β (C) y TNF α (D) 24 h post-LPS medidas mediante qPCR. (E) Comparación en los niveles de expresión del ARNm de $\alpha 7$ nAChR en animales adultos y envejecidos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Salino. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 4 animales/grupo.

5.4. Objetivo 4

La activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial así como el tamaño y densidad de espinas dendríticas en cultivo primario neuronal

Resumen

En este cuarto Objetivo se describe cómo la activación del $\alpha 7$ nAChR incrementa la masa mitocondrial y la tasa de consumo de oxígeno en cultivo primario neuronal. Asimismo, la activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal conduce a un incremento en el tamaño de las espinas dendríticas así como en su densidad, aunque no produce alteraciones a nivel de la arborización dendrítica.

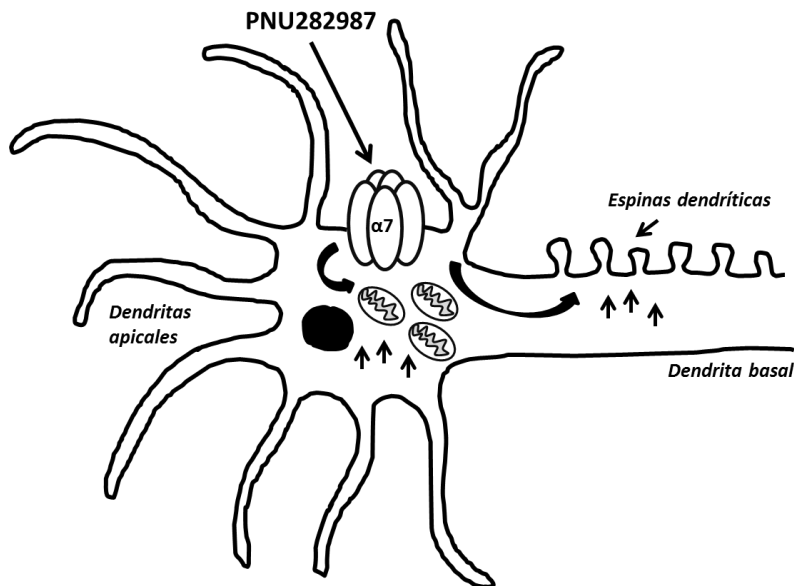


Figura 29. Resumen gráfico de los resultados relativos al Objetivo 4. La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal promueve un aumento en la masa mitocondrial así como un incremento en el tamaño y densidad de las espinas dendríticas.

5.4.1. La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal produce un incremento en la masa y respiración mitocondriales

Tal y como se ha presentado en el Objetivo 2, el PNU282987 produce un incremento tanto en la masa mitocondrial como en la TCO en cultivos mixtos de astrocitos y microglía. En este cuarto objetivo quisimos estudiar si estos efectos eran específicos de células gliales o podían ser trasladados a otros tipos celulares, como las neuronas. Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales de 10 días fueron tratados con PNU282987 10 μ M durante 48 h. Transcurrido el tratamiento, se midió el contenido mitocondrial por inmunofluorescencia de Mtg. Como se puede observar en la **Figura 30A**, el tratamiento con PNU282987 incrementó el marcaje con Mtg lo cual es indicativo de una mayor masa mitocondrial. Para determinar si la mayor masa mitocondrial se asociaba a una mayor respiración, evaluamos la TCO mediante Seahorse. Observamos que, de manera similar a como ocurría en los cultivos gliales, la activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal incrementó los parámetros de Respiración Basal, Respiración acoplada a ATP y Respiración Máxima (**Fig. 30B-D**), sin producir alteraciones en la Fuga de protones (**Fig. 30E**).

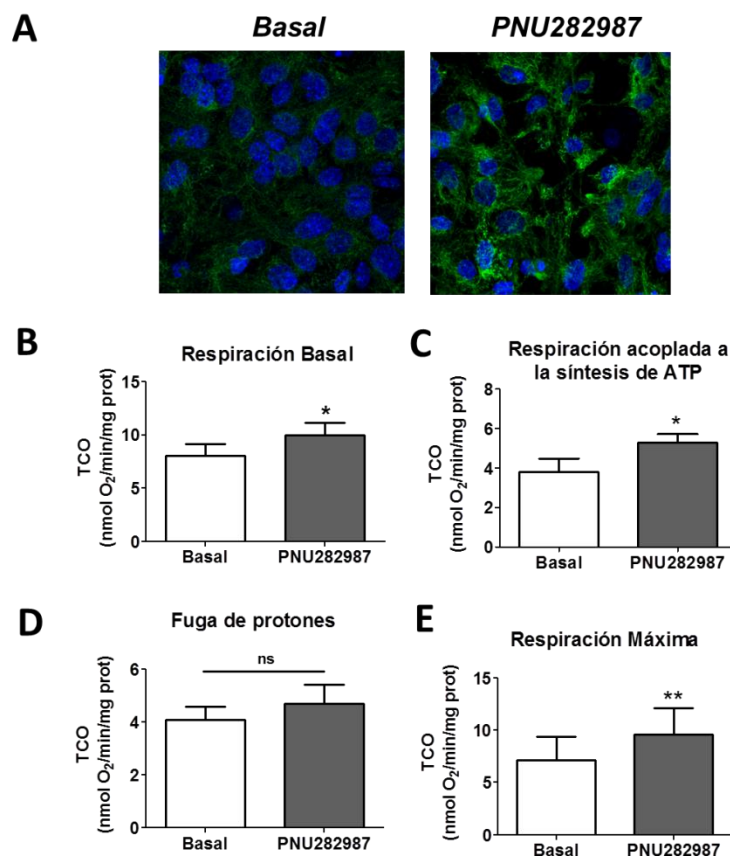


Figura 30. La activación del $\alpha 7$ nAChR produce un incremento en la masa y respiración mitocondriales en cultivo primario neuronal. Los cultivos neuronales se trataron durante 48h con 10 μ M de PNU282987. (A) Imágenes representativas del incremento en la masa mitocondrial medido como marcaje de Mtg por inmunofluorescencia. Cuantificación de la respiración Basal (B), Respiración acoplada a la síntesis de ATP (C), Fuga de protones (D) y Respiración Máxima (E). Para la cuantificación, la respiración no mitocondrial (R + AA) fue sustraída a todos los valores y fueron corregidos por la concentración de proteína. Los gráficos muestran la media \pm e.e.m. de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Basal.

5.4.2. La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal no produce alteraciones en la arborización dendrítica pero incrementa el tamaño y densidad de las espinas dendríticas

Una vez determinado que el tratamiento con el PNU282987 incrementa el contenido mitocondrial y, que las mitocondrias se han implicado en la formación de espinas dendríticas, decidimos estudiar el efecto de la activación del $\alpha 7$ nAChR sobre parámetros asociados a la conectividad sináptica. Para ello, los cultivos primarios de neuronas corticales envejecidos (21 días) y transfectados con GFP, fueron tratados durante 48 h con

PNU282987 10 μ M (**Fig. 31A**). En primer lugar se estudió la arborización sináptica mediante el análisis de Sholl (**Fig. 31B**), no observándose diferencias significativas ni en el número de cruces de las dendritas basales (**Fig. 31C**) ni apicales (**Fig. 31D**). Sin embargo, cuando se realizó el estudio morfológico de las espinas dendríticas se observó que la activación del $\alpha 7$ nAChR promovía un incremento tanto en el tamaño de la cabeza de la espina como en la densidad de las mismas, tal y como puede observarse en las imágenes representativas (**Fig. 31E**) como en la cuantificación (**Fig. 31F, 31G**).

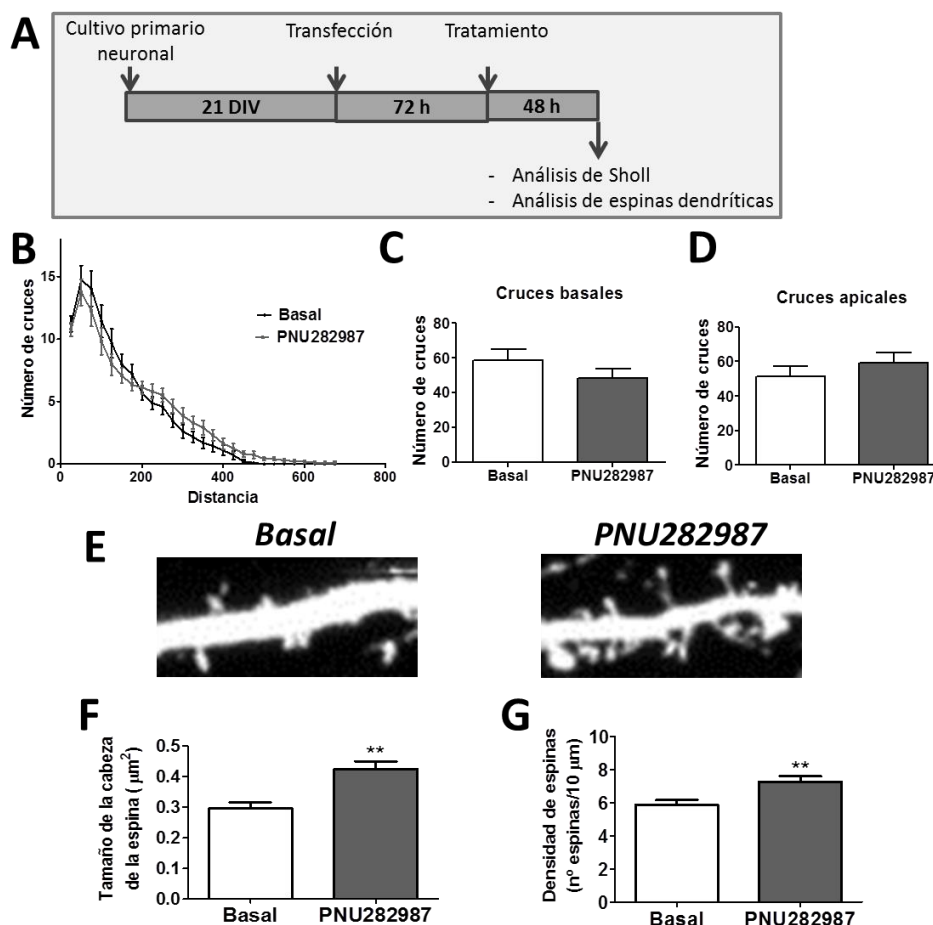


Figura 31. La activación del $\alpha 7$ nAChR no produce cambios en la arborización dendrítica pero incrementa el tamaño y la densidad de las espinas dendríticas. (A) Protocolo experimental. (B) Diagrama representativo de la arborización dendrítica medido mediante el análisis de Sholl. Cuantificación de la arborización de dendritas basales (C) y apicales (D). (E) Imágenes representativas de las espinas dendríticas en situación Basal y PNU282987 tomadas con un objetivo de 63X. (F) Cuantificación del tamaño de las espinas dendríticas. (G) Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas. Los gráficos representan la media \pm e.e.m. de 11-12 neuronas/grupo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Basal.

6. Discusión

En esta Tesis Doctoral se han estudiado, por un lado, las consecuencias fisiopatológicas del estrés oxidativo como consecuencia de una moderada y constante situación de neuro-inflamación y daño mitocondrial para la generación de un modelo *in vitro* de neurodegeneración y, por otro lado, hemos profundizado en el entendimiento de los efectos celulares derivados de la activación del $\alpha 7$ nAChR en fenómenos que pueden contribuir a la protección cerebral como son el control de la masa mitocondrial, el de la neuro-inflamación y la modificación de la conectividad sináptica.

Nos hemos centrado en el daño mitocondrial y la neuro-inflamación, así como la consecuencia última de ambos procesos, el EO, puesto que se trata de eventos patológicos comunes al envejecimiento y a todas las enfermedades neurodegenerativas, de modo que planteamos que una actuación transversal a este nivel podría reportar efectos beneficiosos para la neuroprotección. En cuanto a nuestra diana de trabajo, nos hemos focalizado en el $\alpha 7$ nAChR puesto que existe una correlación negativa entre la actividad de dicho receptor y el envejecimiento/ENDs. Asimismo, la activación de este receptor ha mostrado efectos beneficiosos en numerosos modelos asociados a la patología neurodegenerativa, lo cual nos ha conducido a interesarnos en profundizar en el conocimiento de los mecanismos sub-celulares, así como las consecuencias fisiológicas derivadas de la activación de dicho receptor.

A pesar del gran esfuerzo científico y económico que se ha realizado en las últimas décadas para la búsqueda de tratamientos eficaces que puedan detener el progreso de las ENDs, hasta la fecha la mayoría de los fármacos que han llegado a fase III han sido retirados por falta de eficacia. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de mejorar los modelos pre-clínicos, para que sean más predictivos de la enfermedad humana, y así mejorar la traslación de los resultados a la clínica. Es por esta razón que como primer objetivo de esta Tesis Doctoral nos propusiéramos el desarrollo de un modelo pre-clínico de neurodegeneración de utilidad para el desarrollo de un cribado farmacológico más eficaz y transversal para todas las ENDs. Para el desarrollo de dicho modelo nos centramos en características patológicas comunes tanto al envejecimiento como a las ENDs asociadas a la edad: una situación sub-crónica de inflamación y daño mitocondrial, cuya consecuencia final es el EO. Como modelo de trabajo decidimos emplear cultivos organotípicos de

hipocampo, lo cual nos reporta tres importantes ventajas: (i) nos ha permitido desarrollar un modelo sub-crónico (*vs* otros modelos *in vitro* que suelen ser agudos) y, por lo tanto, más próximo a la realidad fisiológica; (ii) al ser un cultivo derivado de un tejido, co-existen todos los tipos celulares y se mantiene la integridad tisular; y (iii) se trata de un modelo *in vitro*, por lo tanto apto para poder realizar un cribado (menores costes a nivel económico, a nivel de tiempo invertido y disminuye el uso de animales frente a los estudios *in vivo*). Elegimos la región del hipocampo puesto que es una zona cerebral que resulta dañada en muchas ENDS, especialmente en aquellas que cursan con demencia.

Para modelizar la situación de EO, empleamos estímulos presentes en el SNC durante el envejecimiento/neurodegeneración, como son una situación de inflamación sub-crónica (la cual reflejamos mediante el empleo de LPS) y el acúmulo de daño mitocondrial (lo cual conseguimos empleando el bloqueante del complejo mitocondrial III, AA). La combinación de bajas concentraciones de LPS y AA produjo un efecto aditivo en la muerte celular, siendo los niveles de muerte de la combinación LPS/AA significativamente superiores a los de los estímulos por separado (**Fig. 11**). Este hecho pone de manifiesto que ambos estímulos estarían actuando de manera sinérgica, interaccionando y desencadenando un bucle de retroalimentación positivo con consecuencias nocivas para la viabilidad celular. La consecuencia patológica más reseñable derivada de la combinación LPS/AA fue el daño mitocondrial y consecuente desencadenamiento de una situación de exacerbado EO. Los efectos del LPS *per se* a nivel de daño mitocondrial/EO fueron limitados, no se obtuvieron alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial y los incrementos en especies reactivas de oxígeno (medido mediante la sonda fluorescente H₂DCFDA) y en radical superóxido –O₂⁻ (dihidroetidio) fueron limitados y no denotaron diferencias significativas frente a la variable Basal; diferencias que sí fueron observadas con el bloqueo del complejo III mitocondrial. Sin embargo, cuando se empleó la combinación LPS/AA, se obtuvo una respuesta aditiva, significativamente superior a los estímulos por separado, indicando que aunque los efectos del LPS *per se* no fueran demasiado remarcables, sí contribuye al EO incrementado de manera significativa la producción de ERO (**Fig. 12A-C**). De cara a ahondar en el conocimiento del estado oxidativo generado, evaluamos la implicación de la enzima NADPH oxidasa (Nox), que cataliza la formación del radical O₂⁻. Existen distintas isoformas de esta enzima; entre ellas, decidimos centrarnos en la Nox4 puesto que Park y

colaboradores publicaron una relación directa entre esta enzima y el receptor TLR4 (la activación de TLR4 vía LPS derivaba en una activación de Nox4) y demostraron que la activación de esta enzima era necesaria para el incremento de ERO derivadas del tratamiento con LPS así como para la activación del factor de transcripción NF- κ B (Park et al., 2004). En nuestras condiciones de trabajo observamos que tanto el LPS como la AA produjeron una inducción (aunque no significativa) de Nox4, alcanzándose niveles de expresión de esta enzima significativamente superiores con la variable LPS/AA (**Fig. 12D**). El hecho de que el LPS produzca la inducción de esta enzima explicaría tanto los incrementos de EO observados con esta variable así como el efecto sinérgico derivado de la combinación LPS/AA. Otra consecuencia patológica observada tras el tratamiento con la combinación LPS/AA fue el incremento en la formación de agregados proteicos ricos en láminas β (**Fig. 12E**). Estos resultados son interesantes puesto que una característica común en las ENDs es la formación de acúmulos proteicos aberrantes, como son los agregados de β -amiloide en la EA o de α -sinucleína en la EP. Determinamos que el EO derivado de la combinación LPS/AA parecía ser el responsable de la generación de estos acúmulos proteicos puesto que el empleo de un secuestrador de ERO, como es la N-acetil-cisteína (NAC), previno la formación de dichos agregados. Con estos resultados podemos afirmar que niveles bajos pero constantes de neuro-inflamación y daño mitocondrial, que son característicos durante el envejecimiento/neurodegeneración, actuarían conjuntamente orquestando una situación de exacerbado EO, lo que a su vez desencadenaría una proteinopatía, conduciendo en última instancia a la muerte celular.

Tal y como se ha presentado en la Introducción, durante el envejecimiento/neurodegeneración existe una disminución en la funcionalidad de los receptores nicotínicos, entre ellos los $\alpha 7$ nAChRs (Picciotto and Zoli, 2002), lo cual se asocia con los déficits cognitivos. En la actualidad, un grupo de fármacos aprobados para el tratamiento de la EA son los anticolinesterásicos (donepezilo, galantamina y rivastigmina) que favorecen la presencia de acetilcolina en la brecha sináptica al inhibirse su degradación. Estos fármacos proporcionan únicamente una mejoría modesta y transitoria de la sintomatología y estabilizan durante algunos meses el deterioro cognitivo. Sin embargo, más allá de su limitada eficacia, uno de los principales inconvenientes de estos fármacos son sus efectos secundarios debidos a la hiperactividad muscarínica periférica como son

náuseas, vómitos, diarreas, calambres abdominales e hipersecreción glandular (Campos et al., 2016). Es por ello que, tanto nuestro grupo como otros investigadores, apuntan hacia la activación específica de ciertos sub-tipos de estos receptores, como estrategia para obtener neuroprotección al tiempo que se eviten los efectos secundarios antes mencionados.

En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el sub-tipo $\alpha 7$ nAChR, puesto que se trata del más abundante a nivel de SNC (Gotti and Clementi, 2004) y su activación ha reportado efectos positivos en diversos modelos asociados a patología, no sólo EA (Medeiros et al., 2014; Sadigh-Eteghad et al., 2015) sino también otras ENDs como la EP (Quik et al., 2015). Además, experimentos previos de nuestro grupo habían demostrado que la activación del receptor $\alpha 7$ activaba la vía de señalización de pro-supervivencia PI3K/Akt/Jak-2 conduciendo, en última instancia, a la inducción de la enzima anti-oxidante y anti-inflamatoria HO-1 (Parada et al., 2013a; Parada et al., 2010). Nos planteamos, por lo tanto, estudiar los efectos de la activación $\alpha 7$ nAChR en nuestro modelo de estudio, empleando para ello un agonista selectivo, el PNU282987, el cual se empleó en co-tratamiento con los estímulos tóxicos LPS/AA.

En primer lugar, corroboramos que en el presente modelo de neurodegeneración, el empleo del PNU282987 produjo la inducción de la enzima HO-1 (**Fig. 13B**), y esta inducción parecía ser dependiente de la actividad de Nrf2 ya que se observó una mayor translocación al núcleo de este factor de transcripción tras el tratamiento con dicho compuesto (**Fig. 13A**). Más allá de la inducción de HO-1, se observó que el co-tratamiento con el PNU282987 redujo a niveles cercanos a la basal todas las consecuencias patológicas asociadas al presente modelo de neurodegeneración, es decir, redujo la muerte celular, la producción de ERO y la formación de los agregados proteicos; siendo todos estos efectos $\alpha 7$ específicos, puesto que los efectos del PNU282987 se perdieron cuando se bloqueó el receptor con su antagonista selectivo la α -Bgtx (**Fig. 13C, 14**). Los efectos neuroprotectores del receptor $\alpha 7$ están en línea con resultados de la bibliografía, sin embargo los efectos a nivel de EO y proteinopatía no han sido hasta la fecha del todo esclarecidos. La gran mayoría de los trabajos publicados sobre el receptor $\alpha 7$ reportan efectos anti-oxidantes así como protección frente a situaciones de EO (Han et al., 2014b; Liu et al., 2015; Parada et al., 2013b); hecho que puede ser explicado por la inducción observada de la enzima anti-

oxidante HO-1. Sin embargo, cabe mencionar que existen trabajos que van en la línea contraria, indicando que la activación de dicho receptor incrementaría la producción de ERO (Escubedo et al., 2009; Tsoyi et al., 2011); sin embargo, en estos trabajos observan una entrada de Ca^{2+} tras la activación $\alpha 7$, contrariamente a nuestros resultados. Este hecho podría explicar los aumentos de EO observados por estos autores, ya que el incremento de los niveles de Ca^{2+} se asocia a una mayor actividad de la CTE así como una inducción de Nox. También existe cierta controversia acerca del efecto del $\alpha 7$ nAChR sobre los agregados proteicos. Experimentos *in vitro* frente al daño por β -amiloide demostraron efectos positivos de la activación $\alpha 7$ (Kihara et al., 2001; Medeiros et al., 2014), sin embargo, la administración de un agonista $\alpha 7$ a animales triple-transgénicos para la EA, no reportó una disminución en los niveles de β -amiloide (Medeiros et al., 2014). En nuestro caso, observamos que el PNU282987 previno la formación de agregados proteicos, efecto que presumiblemente podría ser debido a sus efectos anti-oxidantes. Sin embargo, quedaría por esclarecer la capacidad de esta estrategia farmacológica para disolver placas ya pre-establecidas y no únicamente su capacidad para prevenir su formación. En cuanto a la importancia del eje de señalización Nrf2/HO-1, se corroboró mediante el empleo de un inhibidor de la HO-1, la protoporfirina-IX (SnPP), obteniendo que cuando se inhibía la actividad de esta enzima los resultados positivos derivados del tratamiento con el PNU282987 eran abolidos, perdiéndose la neuroprotección, los efectos antioxidantes y la reducción de la proteinopatía. Estos resultados se pueden explicar por el hecho de que tanto la enzima HO-1 como sus sub-productos tienen capacidad anti-oxidante, de manera que en ausencia de actividad de esta enzima se generaría un ambiente de EO, que desencadenaría la formación de agregados proteicos y la muerte celular.

Con este estudio hemos establecido un nuevo modelo *in vitro* de neurodegeneración mediante la asociación de dos características patológicas asociadas al envejecimiento/neurodegeneración como son una inflamación crónica pero de baja intensidad y un daño mitocondrial, y hemos determinado que como consecuencia de ello se produce una situación de EO exacerbado lo que a su vez conduce al acúmulo de agregados proteicos aberrantes, produciéndose como consecuencia última la muerte celular. Todas estas consecuencias patológicas (muerte celular, EO y proteinopatía) son prevenidas mediante la activación del receptor $\alpha 7$ en un mecanismo que implica la activación del eje

Nrf2/HO-1. Una vez establecida la contribución de la neuro-inflamación y el daño mitocondrial al proceso de neurodegeneración, así como los efectos neuroprotectores de la activación del receptor $\alpha 7$, el segundo objetivo de esta Tesis ha ido encaminado a estudiar los efectos celulares derivados de la activación $\alpha 7$, estudiando los efectos tanto en células gliales como en neuronas.

De esta manera, en el segundo Objetivo de esta Tesis Doctoral nos propusimos ahondar en el estudio de los efectos que tendría la activación de este receptor a nivel de la función mitocondrial y, más concretamente, a nivel de la ruta de biogénesis mitocondrial en células gliales. El envejecimiento cerebral se acompaña de un estado hipo-metabólico el cual precede a la patofisiología de las ENDs (Yao et al., 2009). Las células gliales juegan un papel protagonista a nivel de SNC, cumpliendo numerosas funciones tales como aporte metabólico, respuesta inmune, homeostasia de iones, etc; y su correcto funcionamiento es vital para la supervivencia neuronal. Es por ello que decidimos centrarnos inicialmente en el efecto que la activación del $\alpha 7$ nAChR podría tener sobre el metabolismo mitocondrial de las células gliales. La hipótesis de partida para llevar a cabo dicho estudio fueron las observaciones publicadas por el grupo de Suliman y Piantadosi que mostraron que el CO (Suliman et al., 2007) y la HO-1 (Piantadosi et al., 2008) activaban la biogénesis mitocondrial. Partiendo del hecho de que la activación del $\alpha 7$ nAChR producía un incremento en la expresión de la HO-1 demostrado en el Objetivo 1 así como en la literatura (Parada et al., 2010), decidimos estudiar si se producirían cambios a nivel de masa mitocondrial tras el tratamiento con el PNU282987.

Comenzamos este estudio trabajando con cultivos primarios mixtos de astrocitos y microglía, los cuales tratamos con PNU282987 (10 μ M durante 48 h), observando que la activación del $\alpha 7$ nAChR conducía a un incremento en el número de mitocondrias (**Fig. 16**) y en la actividad energética de las mismas (**Fig. 17**), de modo que podríamos concluir que las nuevas mitocondrias generadas como consecuencia de la activación colinérgica eran funcionales. Además, no se observaron cambios en el parámetro TMRE/Mtg, indicando que las mitocondrias generadas presentaban un potencial de membrana mitocondrial acorde (**Fig. 16G**). La activación del $\alpha 7$ nAChR promovió la formación de mitocondrias en la población microglial no sólo *in vitro* sino también *in vivo*. Estos resultados aportan nueva

información acerca de las funciones celulares reguladas por el $\alpha 7$ nAChR con interesantes consecuencias para la neuroprotección ya que una de las características fisiopatológicas asociadas al envejecimiento/ENDs es la disminución de la bioenergética cerebral. Así, estudios de PET demuestran que el consumo de glucosa cerebral se ve comprometido según se avanza en edad y, de manera más relevante en enfermedades como la EA y la EP, empleándose como factor diagnóstico. De ahí que el hallazgo de que la activación del $\alpha 7$ nAChR tenga un efecto mitocondriogénico y aumente, consecuentemente, el consumo de oxígeno celular, aporta una nueva evidencia del empleo de esta estrategia farmacológica para el tratamiento de las ENDs.

De cara a ahondar en el mecanismo molecular de señalización implicado en el proceso de biogénesis, empezamos centrándonos en el papel de la enzima HO-1 en base a las evidencias antes mencionadas que correlacionaban HO-1 y la biogénesis mitocondrial. Una vez demostrado que el PNU282987 inducía un incremento en la expresión de la enzima HO-1 en los cultivos gliales (**Fig. 18B**), empleamos el inhibidor farmacológico SnPP, demostrando con él la implicación de la enzima en el incremento de la masa mitocondrial y del metabolismo energético, ya que dichos procesos se veían abolidos cuando HO-1 estaba inhibida (**Fig. 18C-H**). Puesto que la expresión de esta enzima está regulada por el factor de transcripción Nrf2, decidimos estudiar su posible implicación en este proceso. Para ello, realizamos cultivos gliales de animales WT y animales Nrf2^{-/-}, observando que Nrf2 es necesario para el efecto mitocondriogénico mediado por el $\alpha 7$ nAChR (**Fig. 18A**). Finalmente, con la idea de corroborar la implicación de la enzima HO-1 de manera más concluyente, empleamos animales LysM^{Cre}Hmox1 ^{Δ/Δ} , ratones transgénicos que no expresan la enzima HO-1 específicamente en la línea mieloide (lo cual incluye a las células de microglía). De estos experimentos pudimos sacar dos conclusiones interesantes. Por un lado, concluimos que la ausencia de HO-1 en dichos ratones transgénicos implica un menor contenido mitocondrial en las células microgliales, indicando la importancia de esta enzima para el mantenimiento basal de la población mitocondrial celular. En segundo lugar, corroboramos que en los animales que carecen de HO-1, el PNU282987 fue incapaz de incrementar el contenido mitocondrial (**Fig. 20E, 20F**). Con todo ello, podemos concluir que el proceso de biogénesis mitocondrial activado por $\alpha 7$ nAChR es dependiente de la actividad del eje Nrf2/HO-1.

Tal y como se ha descrito en la Introducción, existen numerosas situaciones y, por lo tanto, vías de señalización, que conducen a una mayor demanda energética. Sin embargo, dentro de la complejidad en la regulación del metabolismo energético, el co-factor transcripcional PGC-1 α juega un papel central. Los resultados de esta Tesis demuestran que la activación del $\alpha 7$ nAChR efectivamente induce un aumento en la expresión de PGC-1 α (**Fig. 19A**). La regulación de este factor es compleja, se puede regular tanto a nivel de transcripción como a través de modificaciones post-transduccionales (incluyendo fosforilación, ubiquitinación, des-acetilación, etc). En los cultivos gliales tratados con PNU282987 hubo un incremento significativo de la fosforilación (y por tanto la activación) tanto del factor de transcripción p-CREB (inductor muy potente de la expresión de PGC-1 α) como de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) (implicada en la fosforilación y activación de PGC-1 α), indicando que ambas proteínas podrían estar implicadas en la vía de señalización por la cual la activación del $\alpha 7$ nAChR conduciría a mayores niveles de PGC-1 α (**Fig. 19D, 19E**).

Existen evidencias en la literatura que correlacionan la expresión de PGC-1 α con Nrf2, aunque la relación directa entre ambos factores no haya sido establecida. De hecho, ambos factores de transcripción cumplen funciones comunes en la regulación del sistema antioxidante, regulando al alza enzimas antioxidantes tales como las SODs o las glutatión peroxidasas (Baldelli et al., 2013), entre otras. Estas nociones abren la posibilidad de que la expresión de un gen pudiese estar regulada por el otro. En esta línea, se ha descrito, por un lado, que PGC-1 α incrementa la expresión de Nrf2 en un modelo de daño metabólico (Aquilano et al., 2013) aunque otros autores no encontraron diferencias en los niveles de expresión de Nrf2 en células MEF procedentes de animales PGC-1 $\alpha^{-/-}$ en comparación con sus controles (Olmos et al., 2013). Por otro lado, el promotor de PGC-1 α tiene dos secuencias consenso ARE (Baldelli et al., 2013; St-Pierre et al., 2006) las cuales a día de hoy no se sabe si serían activas. Con la intención de estudiar esta última regulación, se transfectaron células MEF con el promotor de PGC-1 α unido a luciferasa y se demostró que Nrf2 incrementaba la expresión de PGC-1 α (**Fig. 19C**). En cuanto a la implicación de PGC-1 α en la biogénesis mitocondrial activada por el PNU282987 es clara tal como se evidencia a partir de los datos de shARN (del inglés *small hairpin RNA*) (**Fig. 19B**) y los estudios *in vivo* realizados en animales PGC-1 $\alpha^{-/-}$, que aparte de presentar un menor contenido

mitocondrial a nivel microglial en comparación con los animales control, el PNU282987 no produjo un incremento en la masa mitocondrial. Estos resultados son interesantes desde un punto de vista farmacológico puesto que PGC-1 α se está postulando como una diana para el tratamiento de las ENDs. Tal y como se ha descrito en la Introducción, los animales PGC-1 $\alpha^{-/-}$ desarrollan neurodegeneración en estadios más tempranos (Lin et al., 2004) y PGC-1 α se ha visto implicado en diferentes ENDs como la EA y la EP, en ambas patologías los niveles de este co-factor transcripcional se encuentran disminuidos, contribuyendo de manera directa al desarrollo de la patofisiología de estas enfermedades (Chaturvedi and Flint Beal, 2013). Es por ello importante la búsqueda de compuestos que puedan activar PGC-1 α como herramienta farmacológica útil para el tratamiento de estas patologías.

Puesto que la mitocondria está considerada como el principal orgánulo productor de ERO, y el EO se correlaciona con la patología y la muerte celular, comprobamos si el aumento en la masa mitocondrial podría conducir a una mayor situación de EO, que el última instancia sería perjudicial para la célula. El hecho de que un mayor metabolismo energético no derive en una situación de mayor EO (**Fig. 16F**), podría explicarse en base a las proteínas de señalización implicadas en este proceso: HO-1 y PGC-1 α . Los efectos antioxidantes de la enzima HO-1 (así como de sus sub-productos) han sido ampliamente demostrados (Bach, 2005; Otterbein et al., 2003), de ahí que el incremento en la masa/actividad mitocondrial que acontece tras el tratamiento con el PNU282987, al ser acompañado de una sobre-expresión de HO-1, no conduzca a una mayor producción de ERO. De manera paralela, también hemos observado la implicación de PGC-1 α en la cascada de señalización activada por el PNU282987, cuya actividad se asocia con la supresión de ERO (St-Pierre et al., 2006) y, por lo tanto, de manera similar a HO-1, explicaría que la mayor masa mitocondrial producida no derive en una mayor producción radicales libres.

De esta manera, podemos concluir que en este segundo Objetivo de la Tesis doctoral hemos hallado una nueva función del $\alpha 7$ nAChR que estaría implicado en aumentar el contenido mitocondrial en células gliales mediante un mecanismo dependiente del factor de transcripción Nrf2 y de las proteínas HO-1 y PGC-1 α . Así, a través del eje $\alpha 7$ nAChR/Nrf-2/HO-1/PGC-1 α las células gliales incrementarían su contenido mitocondrial lo que,

hipotéticamente, podría conferirles una mayor capacidad para resolver situaciones de estrés o daño celular.

Una vez establecidos los efectos de la activación $\alpha 7$ a nivel del metabolismo mitocondrial, decidimos estudiar si este hecho podría traducirse en una mejor funcionalidad de la microglía para resolver situaciones de inflamación. Estudios desarrollados por Suliman y Piantadosi han demostrado que la citocina anti-inflamatoria IL-10 tiene sitios de unión para NRF-2 y el antagonista del receptor de IL-1 β (IL-1 β a) presenta sitios de unión para NRF-1 y, de hecho, la expresión de genes asociados a la biogénesis mitocondrial se correlaciona con la expresión de marcadores anti-inflamatorios y, por consiguiente, con la resolución de la respuesta inflamatoria (Piantadosi et al., 2011). De esta manera, demuestran por primera vez que la activación de la ruta de biogénesis mitocondrial conduce a la producción de herramientas celulares encaminadas a controlar la inflamación. De hecho, la capacidad anti-inflamatoria del $\alpha 7$ nAChR ha sido ampliamente estudiada a nivel SNP donde se ha demostrado que la liberación de ACh tras la estimulación vagal promueve una respuesta anti-inflamatoria para lo cual es imprescindible la actuación del $\alpha 7$ nAChR, puesto que en animales $\alpha 7$ nAChR^{-/-} tal efecto desaparece (Martelli et al., 2014; Wang et al., 2003), lo cual conllevó a la denominación de esta vía como la “Vía colinérgica anti-inflamatoria”.

Se han realizado esfuerzos para trasladar estos resultados a nivel de SNC, sin embargo, la literatura a este respecto es heterogénea. En base a estas premisas, decidimos estudiar la capacidad anti-inflamatoria del agonista nicotínico $\alpha 7$, el PNU282987. Cabe citar, aunque dichos resultados no se presenten como parte de los Resultados de esta Tesis Doctoral, que se desarrollaron experimentos preliminares en co-cultivos de microglía y astrocitos, en los que dicho agonista $\alpha 7$ no demostró ningún efecto anti-inflamatorio frente a LPS. Los primeros autores en intentar trasladar los efectos anti-inflamatorios del $\alpha 7$ a nivel central fueron Shytle y colaboradores, cuyos estudios *in vitro* demostraron que el $\alpha 7$ nAChR estaba presente en la microglía y, además, que el pre-tratamiento con nicotina prevenía de la liberación de TNF- α producida por el LPS (Shytle et al., 2004). Sin embargo, existe controversia a este respecto. Frente a los autores que han observado que la activación del $\alpha 7$ nAChR en cultivo de microglía reduce la liberación de TNF- α ante el estímulo LPS (De

Simone et al., 2005; Shytle et al., 2004; Suzuki et al., 2006); existen otros estudios en los cuales no se han observado dichos efectos. Thomsen y colaboradores no observaron ningún efecto anti-inflamatorio con diferentes agonistas potentes (SSR180711, A-582941, colina) o moduladores alostéricos (PNU120596, NS1738, AVL-3288); sin embargo, obtuvieron que antagonistas como la metilaconitina (MLA) o agonistas débiles (GTS-21 o NS6740) sí que presentaban efectos anti-inflamatorios (Thomsen and Mikkelsen, 2012). Además, el hecho de que se observe neuroprotección tanto con el empleo de altas concentraciones de nicotina (10-100 μ M) (Egea et al., 2007; Kaneko et al., 1997; Park et al., 2007) o con la administración repetida de agonista (Dong et al., 2016; Leite et al., 2014), debiendo acontecer en ambos casos la desensibilización del receptor, ha llevado a plantear la hipótesis de que la desensibilización del receptor conlleve a una posterior regulación al alza y expresión en superficie del $\alpha 7$ nAChR (Di Cesare Mannelli et al., 2014). En cualquier caso, los resultados *in vitro* a día de hoy siguen siendo confusos y no han sido todavía esclarecidos de manera fehaciente los mecanismos moleculares que expliquen los efectos anti-inflamatorios derivados de la activación de este receptor, al menos en cultivo celular.

Tras la falta de efecto obtenida *in vitro*, decidimos desarrollar los experimentos en un modelo *in vivo* pero analizando los efectos específicamente a nivel microglial. Para ello, empleamos un modelo de neuro-inflamación desarrollado por el grupo del Dr. Jonathan Godbout en la Ohio State University, consistente en la inyección de LPS 0.33 mg/kg a animales BALB/c; esta inyección produce inicialmente una respuesta inflamatoria periférica que conduce, posteriormente, a una neuro-inflamación. Como consecuencia, los animales inyectados con LPS presentan en una primera fase (fase de inflamación aguda 0-8 h tras la inyección del LPS) con una elevada expresión de citocinas pro-inflamatorias así como alteraciones comportamentales (disminución de la interacción social y pérdida de locomoción), que se va recuperando conforme se resuelve la inflamación (resolución de la inflamación 8-24 h tras la inyección). Se trata, por tanto, de un modelo *in vivo* idóneo para estudiar la capacidad anti-inflamatoria mediada por $\alpha 7$ nAChR, para lo cual realizamos diversas aproximaciones experimentales.

En un primer protocolo, co-inyectamos el LPS y el PNU282987 (10 mg/kg) i.p. y analizamos, por un lado, sus efectos sobre la pérdida de peso y comportamiento animal a

distintos tiempos (0, 4, 8 y 24 h) y, por otro, la expresión de citocinas tanto en la fase aguda de la inflamación (4 h post-LPS) como en la fase de resolución de la inflamación (24 h post-LPS). La co-administración del agonista $\alpha 7$ demostró una capacidad anti-inflamatoria, previniendo de la pérdida de peso asociada a la inyección del LPS, así como mostrando una mejoría en las pruebas de interacción social y capacidad locomotora (**Fig. 22**). El análisis de citocinas pro-inflamatorias 4 h post-LPS reveló que el tratamiento con el PNU282987 previno significativamente la expresión de IL-1 β , TNF- α e iNOS a nivel microglial (**Fig. 23B-D**). Asimismo, resultados similares se obtuvieron 24 h post-LPS: una prevención de la expresión de IL-1 β y TNF- α (**Fig. 23F, 23G, 24D, 24E**). Estos resultados van acordes con la bibliografía, donde se ha demostrado, aunque de manera indirecta, el papel anti-inflamatorio de este receptor en modelos *in vivo*, algunos de los ejemplos se recogen a continuación: la nicotina reduce el aumento en el número microglial ante una isquemia global en rata (Guan et al., 2014) y frente a la neuro-inflamación inducida por la inyección de LPS en la sustancia nigra (Park et al., 2007), la neuro-inflamación inducida por MPTP puede ser prevenida mediante administración de PNU282987 (Stuckenholtz et al., 2013) o nicotina (Liu et al., 2012), y el agonista PKA 568487 también ha demostrado efecto anti-inflamatorio en un modelo de isquemia + fractura de hueso (Han et al., 2014a). Sin embargo, todos estos estudios demuestran los efectos anti-inflamatorios del agonismo $\alpha 7$ de una manera indirecta, trabajando con distintos modelos de patología. Con nuestro modelo experimental de inyección i.p. de LPS, se demuestra que la activación $\alpha 7$ regula la neuro-inflamación. Sin embargo, se abre la cuestión de si los efectos obtenidos podrían deberse a la actividad del agonista sobre macrófagos periféricos. *A priori*, la única aproximación con la que contábamos eran los resultados de expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-6 en plasma sanguíneo, parámetro en el que el PNU282987 únicamente mostró una tendencia a reducirlo en fase aguda, aunque sin arrojar diferencias significativas (**Fig. 23E, 23H**).

Para poder trasladar la existencia de la “Vía colinérgica anti-inflamatoria” a nivel de SNC decidimos realizar un segundo protocolo experimental consistente en la inyección i.c.v. del PNU282987. En este segundo protocolo experimental decidimos, adicionalmente, inyectar el PNU282987 2 h post-LPS (tiempo al que el daño ya está establecido (Norden et al., 2015)); de esta manera podíamos discernir si el efecto anti-inflamatorio mediado por el $\alpha 7$ nAChR era capaz sólo de prevenir o, si no también de revertir el daño. A pesar de que

no se obtuvo una mejoría ni a nivel de pérdida de peso ni en actividad locomotora en los animales tratados con 10 μ g de PNU282987, sí que mostraron una rápida recuperación en el test de interacción social a partir de las 8 h post-LPS (**Fig. 25B-D**). Asimismo, cuando se analizó la expresión de citocinas pro-inflamatorias específicamente en la población microglial, se observó una disminución significativa en la expresión de TNF- α y una tendencia similar en la caso de IL-1 β (**Fig. 25E, 25F**), siendo la reducción significativa en ambos casos cuando los experimentos se hicieron en rodajas coronales de cerebro (**Fig. 26A, 26B**). Con estos resultados hemos demostrado que el $\alpha 7$ nAChR cerebral es importante no sólo para prevenir el daño inflamatorio sino que, además, es capaz de revertir dicho daño hasta 2 horas tras el estímulo inflamatorio si el agonista PNU282987 es administrado de manera central.

Los resultados hasta la fecha indican que el agonista $\alpha 7$ es capaz de revertir un estado inflamatorio establecido cuando se administra de manera central, sin embargo, desde el punto de vista farmacológico/clínico es importante que los fármacos sean capaces de revertir un daño mediante la administración periférica. Con este propósito se diseñó un tercer protocolo experimental que consistió en la administración del compuesto de manera periférica 2 h post-LPS (**Fig. 27A**). Los resultados obtenidos con este tercer protocolo no arrojaron ningún efecto positivo del agonista $\alpha 7$: no se detectaron diferencias a nivel de pérdida de peso, interacción social o expresión de citocinas pro-inflamatorias entre los grupos LPS y LPS + PNU282987 (**Fig. 27**). De esta manera, podemos concluir que la ventana terapéutica para el empleo de este compuesto es inferior a las 2 h en el presente modelo. La gran mayoría de estudios que se pueden encontrar en la literatura realizados con agonistas $\alpha 7$ nAChR realizan protocolos de pre-tratamiento (Liu et al., 2012; Stuckenholz et al., 2013). Aunque cabe destacar la existencia de trabajos donde los agonistas $\alpha 7$ se administraron posteriormente al daño, especialmente en modelos asociados a isquemia, donde se han reportado efectos neuroprotectores (Guan et al., 2014; Parada et al., 2013a). Más allá de que se trate de un resultado negativo desde el punto de vista farmacológico, es interesante comparar los efectos de la administración central vs periférica. El hecho de que la administración central del PNU282987, y no la periférica, arroje efectos positivos nos lleva a resaltar la importancia del $\alpha 7$ nAChR a nivel cerebral en el control de la neuroinflamación.

Finalmente, cabe recordar que existe abundante evidencia científica que demuestra las alteraciones fisiológicas que acontecen durante el envejecimiento, encontrándose el sistema inmune especialmente alterado. De hecho, la microglía adquiere el llamado fenotipo “primado” que se caracteriza por una elevada expresión de marcadores pro-inflamatorios al tiempo que resulta más resistente a la regulación por vías anti-inflamatorias (Norden and Godbout, 2013). Es por ello que en el área de las ENDs es primordial ensayar los compuestos no sólo en modelos de animales adultos sino también envejecidos. En este contexto, diseñamos un último protocolo experimental que consistió en la inyección i.c.v. de 10 µg de PNU282987 2 h post-LPS en animales envejecidos (18-19 meses). A pesar de que en animales adultos la administración central del PNU282987 había arrojado resultados positivos, no se observó ninguna mejoría cuando se emplearon animales en edad avanzada, ni a nivel comportamental ni en los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias (**Fig. 28**). Existen ciertos trabajos en los que se ha observado un efecto neuroprotector con diferentes agonistas $\alpha 7$ en animales envejecidos: el tratamiento oral de animales de 15 meses con el agonista A-582941 produjo una mejora cognitiva aunque no afectó ni a las placas ni a los ovillos (Medeiros et al., 2014) o el agonista parcial S 24795 mejoró la pérdida cognitiva asociada a la edad en animales de alrededor de 20 meses (Beracochea et al., 2008; Marighetto et al., 2008). Sin embargo, en el presente modelo, el PNU282987 no revirtió la neuro-inflamación producida por el LPS. Puesto que en dicho modelo el agonista $\alpha 7$ fue inyectado de manera central, planteamos como posibles causas de la falta de efecto: (i) una disminución de la expresión/funcionalidad del $\alpha 7$ nAChR cerebral o (ii) el fenotipo primado de la microglía que sería resistente a regulación por la vía colinérgica. Para intentar responder a esta cuestión, medimos los niveles de expresión del mensajero del $\alpha 7$ nAChR en animales adultos y envejecidos, pero no encontramos diferencias entre ambos grupos. Los resultados en la bibliografía a este respecto son heterogéneos, hay autores que han demostrado una disminución en el marcaje del $\alpha 7$ tanto en humanos como roedores durante el envejecimiento (Nordberg et al., 1992; Spurden et al., 1997) y, otros han demostrado una disminución en la expresión del mensajero (Utsugisawa et al., 1999). Sin embargo, la opinión científica general abogaría que durante el envejecimiento la expresión de marcadores colinérgicos permanecería inalterada y lo que se modificaría sería su funcionalidad (Picciotto and Zoli, 2002). Aunque nuestros datos no reflejen diferencias en

la expresión del mensajero (**Fig. 28E**), no podemos descartar la existencia de alteraciones en el receptor, ya sea a nivel post-transduccional, de localización o de funcionalidad. Más allá de las posibles alteraciones en el $\alpha 7$ debidas al envejecimiento, también planteamos que el fenotipo primado de la microglía podría ser responsable de la falta de efecto. Tal y como se ha descrito en la Introducción, la microglía durante el envejecimiento adquiere un fenotipo más inflamatorio que parece ser debido a una anomalía en los sistemas de regulación. De hecho, se ha descrito que en el envejecimiento existe una reducción en la expresión del IL-10R astrocitario –implicado en la expresión de TGF β –, de modo que los astrocitos envejecidos no estarían regulando el fenotipo M2 microglial a través de TGF β (Norden et al., 2016). Otra evidencia a este respecto sería que la administración *ex vivo* de IL-4 a microglía envejecida no promueve (a diferencia de los adultos) un fenotipo M2 (Henry et al., 2009). Evidenciadas las alteraciones fisiológicas que acontecen al sistema neuro-inmunitario en el envejecimiento y basándonos en los resultados expuestos anteriormente en relación al $\alpha 7$ nAChR, queremos resaltar la importancia de realizar estudios pre-clínicos en animales envejecidos, especialmente en el área de la farmacología dirigida a las ENDs.

Finalmente, en el objetivo 4 hemos querido estudiar los efectos de la activación del $\alpha 7$ nAChR a nivel neuronal. A diferencia de las células gliales, la bibliografía que estudia el papel del $\alpha 7$ nAChR en las neuronas es mucho más extensa. Se ha demostrado su expresión en dendritas y soma, donde contribuirían a la generación de potenciales post-sinápticos excitatorios así como a nivel axonal, donde regularían la liberación de neurotransmisores a través de corrientes de calcio (Dani and Bertrand, 2007). Asimismo, se ha demostrado que su activación promueve efectos neuroprotectores tanto *in vitro* (Del Barrio et al., 2011b; Parada et al., 2010) como *in vivo* (Parada et al., 2013a). Sin embargo, su efecto sobre la biología mitocondrial (más allá de sus efectos antioxidantes) no ha sido, al menos bajo nuestro conocimiento, abordado. Así, en el objetivo cuarto de la presente Tesis Doctoral, hemos demostrado como los efectos mitocondriogénicos del PNU282987 observados previamente en células gliales son trasladables a cultivos primarios neuronales (**Fig. 30**). En este objetivo no hemos ahondado en el mecanismo molecular implicado en la biogénesis mitocondrial, aunque cabría esperar una activación del eje $\alpha 7$ nAChR/Nrf2/HO-1/PGC-1 α , tal y como se demostró en las células gliales. Independientemente de la vía de señalización

intracelular, estos resultados resultan relevantes en el área de la neuroprotección puesto que las neuronas son el tipo celular que mayor aporte energético demanda y dicho aporte se encuentra comprometido durante el envejecimiento y las ENDs. Así, el hecho de que la activación del $\alpha 7$ nAChR promueva un incremento en la masa mitocondrial y en la eficiencia energética sería positivo y podría ser uno de los mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores antes citados.

Para la formación de sinapsis, se requiere un incremento en la expresión y activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje así como la actuación de ATPasas que restablezcan el potencial de membrana, siendo procesos dependientes de un alto aporte energético (Hasenstaub et al., 2010). La capacidad energética de las células se incrementa a través del proceso de biogénesis mitocondrial, el cual se está determinando en los últimos años como necesario para la formación y el mantenimiento de sinapsis funcionales. De hecho, Cheng y colaboradores demostraron que la generación de mitocondrias funcionales a través de PGC-1 α era necesaria para la formación de espinas dendríticas, de modo que cuando silenciaban dicho co-factor transcripcional en cultivos primarios de neuronas hipocampales el número y tamaño de espinas se reducía drásticamente (Cheng et al., 2012). También cabe destacar que en animales PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se ve abolido el crecimiento de las neuritas en neuronas estriatales (Lin et al., 2004). Siguiendo en esta línea y basándonos en los efectos mitocondriogénicos del PNU282987, determinamos que la activación del receptor promovía un incremento tanto en la densidad como en el tamaño de las espinas dendríticas (**Fig. 31E-G**). Estos resultados resultan positivos desde el punto de vista terapéutico ya que una mayor densidad de espinas dendríticas se asociaría a un mayor número de sinapsis y, un mayor tamaño de la espina se asociaría con una mayor estabilidad de la misma lo que contribuye a que las conexiones sinápticas sean más fuertes (Kasai et al., 2003). Este hallazgo se correlaciona con la observación de que los animales que no expresan $\alpha 7$ nAChR presentan mayor número de espinas tipo “finas” (del inglés, *thin*) y un menor número de espinas tipo “champiñón” (del inglés, *mushroom*) (Morley and Mervis, 2013), sugiriendo que la ausencia del receptor impide la maduración de las espinas dendríticas. Debido a que la disminución en número/madurez dendrítica se asocia a ENDs tales como la EA (Perez-Cruz et al., 2011), resulta interesante que a través del tratamiento farmacológico con el PNU282987 se pueda promover un incremento en dichos parámetros sinápticos. Así,

con este objetivo demostramos que el $\alpha 7$ nAChR promueve la formación de nuevas mitocondrias neuronales lo que podría explicar su efecto positivo sobre la sinaptogénesis.

7. Conclusiones/Conclusions

Los resultados expuestos a lo largo de esta Tesis Doctoral nos llevan a establecer las siguientes conclusiones:

Conclusiones parciales:

Objetivo I: *La activación del $\alpha 7$ nAChR protege frente al estrés oxidativo a través de la activación de la enzima HO-1*

- La combinación sub-crónica de bajas concentraciones de un estímulo pro-inflamatorio (LPS) y un bloqueante mitocondrial (AA) conducen a una situación de EO, que desencadena proteinopatía y vulnerabilidad celular.
- La co-incubación del agonista nicotínico $\alpha 7$, PNU282987, con LPS/AA demostró poseer efectos anti-oxidantes y previno la formación de los agregados proteicos y la muerte celular mediante un mecanismo HO-1 dependiente.

Objetivo II: *La enzima HO-1 y el factor de transcripción PCG-1 α regulan la biogénesis mitocondrial en la microglía a través de los $\alpha 7$ nAChRs*

- La activación del $\alpha 7$ nAChR mediante el PNU282987 incrementa la masa y la respiración mitocondrial en co-cultivos de microglía y astrocitos.
- El incremento de la masa mitocondrial y del metabolismo energético, mediados vía el $\alpha 7$ nAChR, son dependientes de factor Nrf2, de la actividad de la enzima HO-1 y el factor PGC-1 α .
- La administración intraperitoneal repetida del PNU282987 promueve un incremento de la masa mitocondrial en la microglía de animales WT, pero no de animales LysMcre-Hmox1 Δ/Δ o PGC-1 $\alpha^{-/-}$.

Objetivo III: *La activación del $\alpha 7$ nAChR central tiene un efecto anti-neuroinflamatorio que se pierde durante el envejecimiento*

- La activación del $\alpha 7$ nAChR mediante el empleo del agonista PNU282987 previene las alteraciones comportamentales y de expresión de citocinas pro-inflamatorias a nivel microglial en un modelo de neuro-inflamación producido por LPS.

- El PNU282987 revierte los daños neuro-inflamatorios cuando se administra 2 h post-LPS de manera central pero no cuando la administración es periférica, reflejando la importancia de la señalización colinérgica central para el control de la neuro-inflamación.
- Los efectos anti-neuro-inflamatorios producidos por el PNU282987 en animales adultos se pierde en animales envejecidos, subrayando la necesidad de realizar estudios farmacológicos comparativos a ambas edades.

Objetivo IV: *La activación del $\alpha 7$ nAChR neuronal activa la biogénesis mitocondrial neuronal e incrementa el número y tamaño de las espinas dendríticas*

- La activación del $\alpha 7$ nAChR, mediante el empleo del agonista PNU282987, incrementa la masa mitocondrial y la capacidad energética celular en cultivo primario de neuronas.
- El empleo del PNU282987 en cultivo primario neuronal produce un incremento en el número y tamaño de las espinas dendríticas sin afectar a la arborización dendrítica

La conclusión general de esta Tesis Doctoral es que la activación de los $\alpha 7$ nAChRs puede mejorar el estado bioenergético celular, reducir la respuesta inflamatoria central e incrementar la sinaptogénesis aunque estos resultados deberán ser revisados en el envejecimiento.

The results presented in this Thesis permit us establish the following conclusions:

Partial conclusions:

Objective I: *$\alpha 7$ nAChR activation protects against oxidative stress via HO-1 induction*

- The sub-chronic combination of low concentrations of a pro-inflammatory stimulus (LPS) and a mitochondrial blocker (AA) trigger a situation of oxidative stress, which leads to proteinopathy and cellular vulnerability
- Co-incubation with the $\alpha 7$ nAChR agonist, PNU282987, showed antioxidant effects which prevented the development of protein aggregates and cell death in a mechanism dependent of HO-1

Objective II: *HO-1 and PGC-1 α regulate mitochondrial biogenesis via activation of microglial $\alpha 7$ nAChRs*

- Activation of $\alpha 7$ nAChR using PNU282987 increases mitochondrial mass and mitochondrial respiration in co-cultures of microglia and astrocytes
- The increase in mitochondrial mass and respiration elicited by PNU282987 are dependent on Nrf2, HO-1 and PGC-1 α activation.
- The i.p. administration of PNU282987 promotes an increase in mitochondrial mass in the microglia of WT animals, but is abolished in LysMcre-Hmox1 Δ/Δ or PGC-1 α $^{-/-}$ animals

Objective III: *The activation of central $\alpha 7$ nAChR has an anti-neuroinflammatory effect which is lost during ageing*

- Activation of $\alpha 7$ nAChR using PNU282987 prevents sickness behavior and microglial pro-inflammatory cytokines production in a neuroinflammatory model elicited by LPS
- PNU282987 reverts neuroinflammatory alterations when is centrally administered 2 h post-LPS but not when the administration is peripheric, highlighting the importance of the central cholinergic signaling for the control of inflammation

- The central anti-neuroinflammatory effects elicited by PNU282987 in adults are lost in aged animals, demonstrating the importance of performing comparative pharmacological studies at both ages

Objective IV: *Activation of neuronal $\alpha 7$ nAChR augments mitochondrial mass and increases the dendritic spine head size and spine density*

- Activation of $\alpha 7$ nAChR in primary neuronal cultures increases mitochondrial mass and mitochondrial oxygen consumption
- Treatment of neuronal cultures with PNU282987 increases the dendritic spine head size and spine density but has no effects in dendritic arborization

The overall conclusion of this Thesis is that the activation of $\alpha 7$ nAChR can improve the cellular bioenergetics, decrease the central inflammatory response and increase the synaptogenesis; however, these results need to be confirmed during ageing.

8. Bibliografía

- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, and T. Wyss-Coray. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21:383-421.
- Andreasen, J.T., J.P. Redrobe, and E.O. Nielsen. 2012. Combined alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism and partial serotonin transporter inhibition produce antidepressant-like effects in the mouse forced swim and tail suspension tests: a comparison of SSR180711 and PNU-282987. *Pharmacol Biochem Behav*. 100:624-629.
- Aquilano, K., S. Baldelli, B. Pagliei, S.M. Cannata, G. Rotilio, and M.R. Ciriolo. 2013. p53 orchestrates the PGC-1alpha-mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid Redox Signal*. 18:386-399.
- Arias, E., E. Ales, N.H. Gabilan, M.F. Cano-Abad, M. Villarroja, A.G. Garcia, and M.G. Lopez. 2004. Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 46:103-114.
- Bach, F.H. 2005. Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *FASEB J*. 19:1216-1219.
- Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 120:483-495.
- Baldelli, S., K. Aquilano, and M.R. Ciriolo. 2013. Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1alpha: nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2. *Biochim Biophys Acta*. 1830:4137-4146.
- Baloyannis, S.J. 2006. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 9:119-126.
- Balla, G., H.S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J.W. Eaton, and G.M. Vercellotti. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 267:18148-18153.
- Barja, G. 1998. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci*. 854:224-238.
- Bassani, T.B., M.A. Vital, and L.K. Rauh. 2015. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arq Neuropsiquiatr*. 73:616-623.
- Beracochea, D., A. Boucard, C. Trocme-Thibierge, and P. Morain. 2008. Improvement of contextual memory by S 24795 in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl)*. 196:555-564.
- Bodnar, A.L., L.A. Cortes-Burgos, K.K. Cook, D.M. Dinh, V.E. Groppi, M. Hajos, N.R. Higdon, W.E. Hoffmann, R.S. Hurst, J.K. Myers, B.N. Rogers, T.M. Wall, M.L. Wolfe, and E. Wong. 2005. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*. 48:905-908.
- Borniquel, S., N. Garcia-Quintans, I. Valle, Y. Olmos, B. Wild, F. Martinez-Granero, E. Soria, S. Lamas, and M. Monsalve. 2010. Inactivation of Foxo3a and subsequent

- downregulation of PGC-1 α mediate nitric oxide-induced endothelial cell migration. *Mol Cell Biol.* 30:4035-4044.
- Bratic, A., and N.G. Larsson. 2013. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 123:951-957.
- Brown, G.C., and V. Borutaite. 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 52:189-195.
- Buendia, I., P. Michalska, E. Navarro, I. Gameiro, J. Egea, and R. Leon. 2016. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 157:84-104.
- Burghaus, L., U. Schutz, U. Krempel, J. Lindstrom, and H. Schroder. 2003. Loss of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 4$ and $\alpha 7$ in the cerebral cortex of Parkinson patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 9:243-246.
- Campos, C., N.B. Rocha, R.T. Vieira, S.A. Rocha, D. Telles-Correia, F. Paes, T. Yuan, A.E. Nardi, O. Arias-Carrion, S. Machado, and L. Caixeta. 2016. Treatment of Cognitive Deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatr Danub.* 28:2-12.
- Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster. 1999. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8:265-277.
- Corona, J.C., and M.R. Duchen. 2015. Impaired mitochondrial homeostasis and neurodegeneration: towards new therapeutic targets? *J Bioenerg Biomembr.* 47:89-99.
- Cuadrado, A. 2015. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP. *Free Radic Biol Med.* 88:147-157.
- Chaturvedi, R.K., and M. Flint Beal. 2013. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med.* 63:1-29.
- Cheng, A., R. Wan, J.L. Yang, N. Kamimura, T.G. Son, X. Ouyang, Y. Luo, E. Okun, and M.P. Mattson. 2012. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat Commun.* 3:1250.
- Dani, J.A., and D. Bertrand. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:699-729.
- Dantzer, R., J.C. O'Connor, G.G. Freund, R.W. Johnson, and K.W. Kelley. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9:46-56.
- de la Monte, S.M., T. Luong, T.R. Neely, D. Robinson, and J.R. Wands. 2000. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Lab Invest.* 80:1323-1335.
- De Simone, R., M.A. Ajmone-Cat, D. Carnevale, and L. Minghetti. 2005. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. *J Neuroinflammation.* 2:4.
- Deardorff, W.J., A. Shobassy, and G.T. Grossberg. 2015. Safety and clinical effects of EVP-6124 in subjects with Alzheimer's disease currently or previously receiving an acetylcholinesterase inhibitor medication. *Expert Rev Neurother.* 15:7-17.
- DeKosky, S.T., and S.W. Scheff. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 27:457-464.

- del Barrio, L., J. Egea, R. Leon, A. Romero, A. Ruiz, M. Montero, J. Alvarez, and M.G. Lopez. 2011a. Calcium signalling mediated through alpha7 and non-alpha7 nAChR stimulation is differentially regulated in bovine chromaffin cells to induce catecholamine release. *Br J Pharmacol.* 162:94-110.
- Del Barrio, L., M.D. Martin-de-Saavedra, A. Romero, E. Parada, J. Egea, J. Avila, J.M. McIntosh, S. Wonnacott, and M.G. Lopez. 2011b. Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by alpha7 and beta2* nicotinic stimulation. *Toxicol Sci.* 123:193-205.
- Di Cesare Mannelli, L., A. Pacini, C. Matera, M. Zanardelli, T. Mello, M. De Amici, C. Dallanocce, and C. Ghelardini. 2014. Involvement of alpha7 nAChR subtype in rat oxaliplatin-induced neuropathy: effects of selective activation. *Neuropharmacology.* 79:37-48.
- Di Cesare Mannelli, L., B. Tenci, M. Zanardelli, P. Failli, and C. Ghelardini. 2015. alpha7 Nicotinic Receptor Promotes the Neuroprotective Functions of Astrocytes against Oxaliplatin Neurotoxicity. *Neural Plast.* 2015:396908.
- Dineley, K.T., A.A. Pandya, and J.L. Yakel. 2015. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 36:96-108.
- Dominy, J.E., and P. Puigserver. 2013. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Dong, M.W., M. Li, J. Chen, T.T. Fu, K.Z. Lin, G.H. Ye, J.G. Han, X.P. Feng, X.B. Li, L.S. Yu, and Y.Y. Fan. 2016. Activation of alpha7nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF-alpha Production. *Inflammation.* 39:687-699.
- Doty, K.R., M.V. Guillot-Sestier, and T. Town. 2015. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? *Brain Res.* 1617:155-173.
- Duan, H., S.L. Wearne, A.B. Rocher, A. Macedo, J.H. Morrison, and P.R. Hof. 2003. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex.* 13:950-961.
- Ebrahimi, S., and S. Okabe. 2014. Structural dynamics of dendritic spines: molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1838:2391-2398.
- Egea, J., A.O. Rosa, M. Sobrado, L. Gandia, M.G. Lopez, and A.G. Garcia. 2007. Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience.* 145:866-872.
- Escubedo, E., J. Camarasa, C. Chipana, S. Garcia-Rates, and D. Pubill. 2009. Involvement of nicotinic receptors in methamphetamine- and MDMA-induced neurotoxicity: pharmacological implications. *Int Rev Neurobiol.* 88:121-166.
- Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-145.
- Farooqui, T., and A.A. Farooqui. 2009. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.* 130:203-215.
- Fenn, A.M., C.J. Henry, Y. Huang, A. Dugan, and J.P. Godbout. 2012. Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain Behav Immun.* 26:766-777.

- Fernandes, R.O., J.H. Bonetto, B. Baregzay, A.L. de Castro, S. Puukila, H. Forsyth, P.C. Schenkel, S.F. Llesuy, I.S. Brum, A.S. Araujo, N. Khaper, and A. Bello-Klein. 2015. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1alpha stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Mol Cell Biochem.* 401:61-70.
- Franceschi, C., M. Bonafe, and S. Valensin. 2000a. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine.* 18:1717-1720.
- Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani, and G. De Benedictis. 2000b. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908:244-254.
- Franceschi, C., S. Valensin, F. Fagnoni, C. Barbi, and M. Bonafe. 1999. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol.* 34:911-921.
- Francis, P.T., A.M. Palmer, M. Snape, and G.K. Wilcock. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 66:137-147.
- Frank-Cannon, T.C., L.T. Alto, F.E. McAlpine, and M.G. Tansey. 2009. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 4:47.
- Fukui, H., and C.T. Moraes. 2008. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci.* 31:251-256.
- Gahwiler, B.H., M. Capogna, D. Debanne, R.A. McKinney, and S.M. Thompson. 1997. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20:471-477.
- Galea, I., I. Bechmann, and V.H. Perry. 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28:12-18.
- Gerhard, A., N. Pavese, G. Hotton, F. Turkheimer, M. Es, A. Hammers, K. Eggert, W. Oertel, R.B. Banati, and D.J. Brooks. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 21:404-412.
- Gimenez-Llort, L., I. Mate, R. Manassra, C. Vida, and M. De la Fuente. 2012. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1262:74-84.
- Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio, and P.G. Pelicci. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:722-728.
- Gotti, C., and F. Clementi. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 74:363-396.
- Gotti, C., M. Zoli, and F. Clementi. 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci.* 27:482-491.
- Guan, Y.Z., X.D. Jin, L.X. Guan, H.C. Yan, P. Wang, Z. Gong, S.J. Li, X. Cao, Y.L. Xing, and T.M. Gao. 2014. Nicotine Inhibits Microglial Proliferation and Is Neuroprotective in Global Ischemia Rats. *Mol Neurobiol.*
- Han, Z., L. Li, L. Wang, V. Degos, M. Maze, and H. Su. 2014a. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative

- stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture. *J Neurochem.* 131:498-508.
- Han, Z., F. Shen, Y. He, V. Degos, M. Camus, M. Maze, W.L. Young, and H. Su. 2014b. Activation of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress. *PLoS One.* 9:e105711.
- Hardeland, R., D.P. Cardinali, G.M. Brown, and S.R. Pandi-Perumal. 2015. Melatonin and brain inflammaging. *Prog Neurobiol.* 127-128:46-63.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11:298-300.
- Harman, D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20:145-147.
- Harry, G.J. 2013. Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther.* 139:313-326.
- Hasenstaub, A., S. Otte, E. Callaway, and T.J. Sejnowski. 2010. Metabolic cost as a unifying principle governing neuronal biophysics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:12329-12334.
- Hattingen, E., J. Magerkurth, U. Pilatus, A. Mozer, C. Seifried, H. Steinmetz, F. Zanella, and R. Hilker. 2009. Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain.* 132:3285-3297.
- Hawkins, B.T., R.D. Egleton, and T.P. Davis. 2005. Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H212-219.
- Henry, C.J., Y. Huang, A.M. Wynne, and J.P. Godbout. 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun.* 23:309-317.
- Hu, M., M. Gopalakrishnan, and J. Li. 2009. Positive allosteric modulation of alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lack of cytotoxicity in PC12 cells and rat primary cortical neurons. *Br J Pharmacol.* 158:1857-1864.
- Ingham, C.A., S.H. Hood, and G.W. Arbuthnott. 1989. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503:334-338.
- Innamorato, N.G., A. Jazwa, A.I. Rojo, C. Garcia, J. Fernandez-Ruiz, A. Grochot-Przeczek, A. Stachurska, A. Jozkowicz, J. Dulak, and A. Cuadrado. 2010. Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. *PLoS One.* 5:e11838.
- Jacobs, B., L. Driscoll, and M. Schall. 1997. Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol.* 386:661-680.
- Jones, A.K., and D.B. Sattelle. 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv Exp Med Biol.* 683:25-43.
- Kaneko, S., T. Maeda, T. Kume, H. Kochiyama, A. Akaike, S. Shimohama, and J. Kimura. 1997. Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res.* 765:135-140.
- Kanninen, K., T.M. Malm, H.K. Jyrkkanen, G. Goldsteins, V. Keksa-Goldsteine, H. Tanila, M. Yamamoto, S. Yla-Herttuala, A.L. Levonen, and J. Koistinaho. 2008. Nuclear

- factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol Cell Neurosci.* 39:302-313.
- Kasai, H., M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu, and H. Nakahara. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26:360-368.
- Kihara, T., S. Shimohama, H. Sawada, K. Honda, T. Nakamizo, H. Shibasaki, T. Kume, and A. Akaike. 2001. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem.* 276:13541-13546.
- Krafft, P.R., O. Altay, W.B. Rolland, K. Duris, T. Lekic, J. Tang, and J.H. Zhang. 2012. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism confers neuroprotection through GSK-3beta inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 43:844-850.
- Leite, P.E., L. Gandia, R. de Pascual, C. Nanclares, I. Colmena, W.C. Santos, J. Lagrota-Candido, and T. Quirico-Santos. 2014. Selective activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChRalpha7) inhibits muscular degeneration in mdx dystrophic mice. *Brain Res.* 1573:27-36.
- Li, Z., K. Okamoto, Y. Hayashi, and M. Sheng. 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell.* 119:873-887.
- Lin, J., P.H. Wu, P.T. Tarr, K.S. Lindenberg, J. St-Pierre, C.Y. Zhang, V.K. Mootha, S. Jager, C.R. Vianna, R.M. Reznick, L. Cui, M. Manieri, M.X. Donovan, Z. Wu, M.P. Cooper, M.C. Fan, L.M. Rohas, A.M. Zavacki, S. Cinti, G.I. Shulman, B.B. Lowell, D. Krainc, and B.M. Spiegelman. 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* 119:121-135.
- Liu, Y., J. Hu, J. Wu, C. Zhu, Y. Hui, Y. Han, Z. Huang, K. Ellsworth, and W. Fan. 2012. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against dopaminergic neuron loss in an MPTP mouse model via inhibition of astrocyte activation. *J Neuroinflammation.* 9:98.
- Liu, Y., X. Zeng, Y. Hui, C. Zhu, J. Wu, D.H. Taylor, J. Ji, W. Fan, Z. Huang, and J. Hu. 2015. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 91:87-96.
- Mamiya, T., F. Katsuoka, A. Hirayama, O. Nakajima, A. Kobayashi, J.M. Maher, H. Matsui, I. Hyodo, M. Yamamoto, and T. Hosoya. 2008. Hepatocyte-specific deletion of heme oxygenase-1 disrupts redox homeostasis in basal and oxidative environments. *Tohoku J Exp Med.* 216:331-339.
- Mann, V.M., J.M. Cooper, D. Krige, S.E. Daniel, A.H. Schapira, and C.D. Marsden. 1992. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain.* 115 (Pt 2):333-342.
- Marighetto, A., S. Valerio, A. Desmedt, J.N. Philippin, C. Trocme-Thibierge, and P. Morain. 2008. Comparative effects of the alpha7 nicotinic partial agonist, S 24795, and the cholinesterase inhibitor, donepezil, against aging-related deficits in declarative and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 197:499-508.
- Markesbery, W.R. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23:134-147.

- Marrero, M.B., and M. Bencherif. 2009. Convergence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF-kappaB. *Brain Res.* 1256:1-7.
- Martelli, D., M.J. McKinley, and R.M. McAllen. 2014. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci.* 182:65-69.
- McGeer, P.L., S. Itagaki, H. Tago, and E.G. McGeer. 1987. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett.* 79:195-200.
- McGuire, S.O., Z.D. Ling, J.W. Lipton, C.E. Sortwell, T.J. Collier, and P.M. Carvey. 2001. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol.* 169:219-230.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto, and J.D. Hayes. 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem.* 278:21592-21600.
- Medeiros, R., N.A. Castello, D. Cheng, M. Kitazawa, D. Baglietto-Vargas, K.N. Green, T.A. Esbenshade, R.S. Bitner, M.W. Decker, and F.M. LaFerla. 2014. alpha7 Nicotinic receptor agonist enhances cognition in aged 3xTg-AD mice with robust plaques and tangles. *Am J Pathol.* 184:520-529.
- Miguel-Alvarez, M., A. Santos-Lozano, F. Sanchis-Gomar, C. Fiuza-Luces, H. Pareja-Galeano, N. Garatachea, and A. Lucia. 2015. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a treatment for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of treatment effect. *Drugs Aging.* 32:139-147.
- Min, K.J., M.S. Yang, S.U. Kim, I. Jou, and E.H. Joe. 2006. Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci.* 26:1880-1887.
- Minamino, T., H. Christou, C.M. Hsieh, Y. Liu, V. Dhawan, N.G. Abraham, M.A. Perrella, S.A. Mitsialis, and S. Kourembanas. 2001. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8798-8803.
- Morley, B.J., and R.F. Mervis. 2013. Dendritic spine alterations in the hippocampus and parietal cortex of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. *Neuroscience.* 233:54-63.
- Mosconi, L. 2005. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 32:486-510.
- Nicklas, W.J., I. Vyas, and R.E. Heikkila. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36:2503-2508.
- Nordberg, A., I. Alafuzoff, and B. Winblad. 1992. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J Neurosci Res.* 31:103-111.
- Norden, D.M., A.M. Fenn, A. Dugan, and J.P. Godbout. 2014. TGFbeta produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia.* 62:881-895.
- Norden, D.M., and J.P. Godbout. 2013. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39:19-34.
- Norden, D.M., P.J. Trojanowski, E. Villanueva, E. Navarro, and J.P. Godbout. 2015. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes

- increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*.
- Norden, D.M., P.J. Trojanowski, F.R. Walker, and J.P. Godbout. 2016. Insensitivity of astrocytes to interleukin 10 signaling following peripheral immune challenge results in prolonged microglial activation in the aged brain. *Neurobiol Aging*. 44:22-41.
- Olmos, Y., F.J. Sanchez-Gomez, B. Wild, N. Garcia-Quintans, S. Cabezudo, S. Lamas, and M. Monsalve. 2013. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1alpha complex. *Antioxid Redox Signal*. 19:1507-1521.
- Otterbein, L.E., M.P. Soares, K. Yamashita, and F.H. Bach. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*. 24:449-455.
- Paolicelli, R.C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T.A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino, and C.T. Gross. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 333:1456-1458.
- Parada, E., I. Buendia, E. Navarro, C. Avendano, J. Egea, and M.G. Lopez. 2015. Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. *Mol Nutr Food Res*. 59:1690-1700.
- Parada, E., J. Egea, I. Buendia, P. Negredo, A.C. Cunha, S. Cardoso, M.P. Soares, and M.G. Lopez. 2013a. The Microglial alpha7-Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxid Redox Signal*.
- Parada, E., J. Egea, I. Buendia, P. Negredo, A.C. Cunha, S. Cardoso, M.P. Soares, and M.G. Lopez. 2013b. The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxid Redox Signal*. 19:1135-1148.
- Parada, E., J. Egea, A. Romero, L. del Barrio, A.G. Garcia, and M.G. Lopez. 2010. Poststress treatment with PNU282987 can rescue SH-SY5Y cells undergoing apoptosis via alpha7 nicotinic receptors linked to a Jak2/Akt/HO-1 signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 49:1815-1821.
- Park, H.J., P.H. Lee, Y.W. Ahn, Y.J. Choi, G. Lee, D.Y. Lee, E.S. Chung, and B.K. Jin. 2007. Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. *Eur J Neurosci*. 26:79-89.
- Park, H.S., H.Y. Jung, E.Y. Park, J. Kim, W.J. Lee, and Y.S. Bae. 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol*. 173:3589-3593.
- Pena-Altamira, E., F. Prati, F. Massenzio, M. Virgili, A. Contestabile, M.L. Bolognesi, and B. Monti. 2015. Changing paradigm to target microglia in neurodegenerative diseases: from anti-inflammatory strategy to active immunomodulation. *Expert Opin Ther Targets*:1-14.
- Perea, G., and A. Araque. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 317:1083-1086.
- Perez-Cruz, C., M.W. Nolte, M.M. van Gaalen, N.R. Rustay, A. Termont, A. Tanghe, F. Kirchhoff, and U. Ebert. 2011. Reduced spine density in specific regions of CA1

- pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31:3926-3934.
- Piantadosi, C.A., M.S. Carraway, A. Babiker, and H.B. Suliman. 2008. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res.* 103:1232-1240.
- Piantadosi, C.A., C.M. Withers, R.R. Bartz, N.C. MacGarvey, P. Fu, T.E. Sweeney, K.E. Welty-Wolf, and H.B. Suliman. 2011. Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem.* 286:16374-16385.
- Picciotto, M.R., and M. Zoli. 2002. Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol.* 53:641-655.
- Poirier, J., and A. Barbeau. 1985. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-induced inhibition of nicotinamide adenosine dinucleotide cytochrome c reductase. *Neurosci Lett.* 62:7-11.
- Poulose, N., and R. Raju. 2014. Aging and injury: alterations in cellular energetics and organ function. *Aging Dis.* 5:101-108.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C.J. Walkey, J.C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili, and B.M. Spiegelman. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature.* 423:550-555.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92:829-839.
- Quik, M., D. Zhang, M. McGregor, and T. Bordia. 2015. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 97:399-407.
- Ramsey, C.P., C.A. Glass, M.B. Montgomery, K.A. Lindl, G.P. Ritson, L.A. Chia, R.L. Hamilton, C.T. Chu, and K.L. Jordan-Sciutto. 2007. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66:75-85.
- Redrobe, J.P., E.O. Nielsen, J.K. Christensen, D. Peters, D.B. Timmermann, and G.M. Olsen. 2009. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates scopolamine-induced behavioural changes in a modified continuous Y-maze task in mice. *Eur J Pharmacol.* 602:58-65.
- Rezvani, A.H., and E.D. Levin. 2001. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry.* 49:258-267.
- Robinson, C.M., M.R. Patel, and D.J. Webb. 2016. Super resolution microscopy is poised to reveal new insights into the formation and maturation of dendritic spines. *F1000Res.* 5.
- Sadigh-Eteghad, S., J. Mahmoudi, S. Babri, and M. Talebi. 2015. Effect of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor activation on beta-amyloid induced recognition memory impairment. Possible role of neurovascular function. *Acta Cir Bras.* 30:736-742.
- Sazanov, L.A. 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16:375-388.
- Scarpulla, R.C. 2008. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci.* 1147:321-334.
- Scatena, R., P. Bottoni, and B. Giardina. 2012. Advances in mitochondrial medicine. Springer Verlag, Dordrecht ; New York. xii, 461 p. pp.

- Schipper, H.M. 2004. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med.* 37:1995-2011.
- Schrattenholz, A., E.F. Pereira, U. Roth, K.H. Weber, E.X. Albuquerque, and A. Maelicke. 1996. Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol Pharmacol.* 49:1-6.
- Selkoe, D.J. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 298:789-791.
- Sena, L.A., and N.S. Chandel. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 48:158-167.
- Sharma, G., and S. Vijayaraghavan. 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4148-4153.
- Shaw, S., M. Bencherif, and M.B. Marrero. 2002. Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid. *J Biol Chem.* 277:44920-44924.
- Shytle, R.D., T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A.A. Silver, P.R. Sanberg, and J. Tan. 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem.* 89:337-343.
- Sine, S.M., and A.G. Engel. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature.* 440:448-455.
- Soares, M.P., and F.H. Bach. 2009. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 15:50-58.
- Spurden, D.P., J.A. Court, S. Lloyd, A. Oakley, R. Perry, C. Pearson, R.G. Pullen, and E.K. Perry. 1997. Nicotinic receptor distribution in the human thalamus: autoradiographical localization of [3H]nicotine and [125I] alpha-bungarotoxin binding. *J Chem Neuroanat.* 13:105-113.
- St-Pierre, J., S. Drori, M. Uldry, J.M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jager, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D.K. Simon, R. Bachoo, and B.M. Spiegelman. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127:397-408.
- Stephens, B., A.J. Mueller, A.F. Shering, S.H. Hood, P. Taggart, G.W. Arbuthnott, J.E. Bell, L. Kilford, A.E. Kingsbury, S.E. Daniel, and C.A. Ingham. 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 132:741-754.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N. Glazer, and B.N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235:1043-1046.
- Stuckenholz, V., M. Bacher, M. Balzer-Geldsetzer, D. Alvarez-Fischer, W.H. Oertel, R.C. Dodel, and C. Noelker. 2013. The alpha7 nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *J Parkinsons Dis.* 3:161-172.
- Suliman, H.B., M.S. Carraway, L.G. Tatro, and C.A. Piantadosi. 2007. A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci.* 120:299-308.
- Suliman, H.B., and C.A. Piantadosi. 2014. Mitochondrial biogenesis: regulation by endogenous gases during inflammation and organ stress. *Curr Pharm Des.* 20:5653-5662.
- Suliman, H.B., and C.A. Piantadosi. 2016. Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. *Pharmacol Rev.* 68:20-48.

- Suzuki, T., I. Hide, A. Matsubara, C. Hama, K. Harada, K. Miyano, M. Andra, H. Matsubayashi, N. Sakai, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata. 2006. Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res.* 83:1461-1470.
- Swerdlow, R.H. 2012. Does mitochondrial DNA play a role in Parkinson's disease? A review of cybrid and other supportive evidence. *Antioxid Redox Signal.* 16:950-964.
- Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan. 2010. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 2:S265-279.
- Swerdlow, R.H., and S.M. Khan. 2004. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 63:8-20.
- Swerdlow, R.H., and S.J. Kish. 2002. Mitochondria in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol.* 53:341-385.
- Szalardy, L., D. Zadori, P. Klivenyi, J. Toldi, and L. Vecsei. 2015. Electron Transport Disturbances and Neurodegeneration: From Albert Szent-Gyorgyi's Concept (Szeged) till Novel Approaches to Boost Mitochondrial Bioenergetics. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:498401.
- Takata, K., Y. Kitamura, M. Saeki, M. Terada, S. Kagitani, R. Kitamura, Y. Fujikawa, A. Maelicke, H. Tomimoto, T. Taniguchi, and S. Shimohama. 2010. Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 285:40180-40191.
- Terry, R.D., E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, and R. Katzman. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 30:572-580.
- Thomsen, M.S., and J.D. Mikkelsen. 2012. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- α release from microglia. *J Neuroimmunol.* 251:65-72.
- Tsoyi, K., H.J. Jang, J.W. Kim, H.K. Chang, Y.S. Lee, H.O. Pae, H.J. Kim, H.G. Seo, J.H. Lee, H.T. Chung, and K.C. Chang. 2011. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antioxid Redox Signal.* 14:2057-2070.
- Utsugisawa, K., Y. Nagane, H. Tohgi, M. Yoshimura, H. Ohba, and Y. Genda. 1999. Changes with aging and ischemia in nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha7 mRNA expression in postmortem human frontal cortex and putamen. *Neurosci Lett.* 270:145-148.
- Velez-Fort, M., E. Audinat, and M.C. Angulo. 2009. Functional alpha 7-containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus. *Glia.* 57:1104-1114.
- Verkhatsky, A., M. Olabarria, H.N. Noristani, C.Y. Yeh, and J.J. Rodriguez. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 7:399-412.
- Vernon, P.J., and D. Tang. 2013. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxid Redox Signal.* 18:677-691.
- Villalba, R.M., H. Lee, and Y. Smith. 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol.* 215:220-227.

- Villalba, R.M., and Y. Smith. 2010. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 4:133.
- Villarino, A.V., Y. Kanno, J.R. Ferdinand, and J.J. O'Shea. 2015. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol.* 194:21-27.
- Vina, J., M.C. Gomez-Cabrera, C. Borrás, T. Froio, F. Sanchis-Gomar, V.E. Martínez-Bello, and F.V. Pallardo. 2009. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev.* 61:1369-1374.
- Wake, H., A.J. Moorhouse, S. Jinno, S. Kohsaka, and J. Nabekura. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 29:3974-3980.
- Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, and K.J. Tracey. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421:384-388.
- Wishka, D.G., D.P. Walker, K.M. Yates, S.C. Reitz, S. Jia, J.K. Myers, K.L. Olson, E.J. Jacobsen, M.L. Wolfe, V.E. Groppi, A.J. Hanchar, B.A. Thornburgh, L.A. Cortes-Burgos, E.H. Wong, B.A. Staton, T.J. Raub, N.R. Higdon, T.M. Wall, R.S. Hurst, R.R. Walters, W.E. Hoffmann, M. Hajos, S. Franklin, G. Carey, L.H. Gold, K.K. Cook, S.B. Sands, S.X. Zhao, J.R. Soglia, A.S. Kalgutkar, S.P. Arneric, and B.N. Rogers. 2006. Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship. *J Med Chem.* 49:4425-4436.
- Woolfrey, K.M., and D.P. Srivastava. 2016. Control of Dendritic Spine Morphological and Functional Plasticity by Small GTPases. *Neural Plast.* 2016:3025948.
- Yachie, A., Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, and S. Koizumi. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 103:129-135.
- Yao, J., R.W. Irwin, L. Zhao, J. Nilsen, R.T. Hamilton, and R.D. Brinton. 2009. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:14670-14675.
- Yet, S.F., R. Tian, M.D. Layne, Z.Y. Wang, K. Maemura, M. Solovyeva, B. Ith, L.G. Melo, L. Zhang, J.S. Ingwall, V.J. Dzau, M.E. Lee, and M.A. Perrella. 2001. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* 89:168-173.
- Zaja-Milatovic, S., D. Milatovic, A.M. Schantz, J. Zhang, K.S. Montine, A. Samii, A.Y. Deutch, and T.J. Montine. 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology.* 64:545-547.
- Zhang, H., K.J. Davies, and H.J. Forman. 2015. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 88:314-336.

Recursos web:

Organización Mundial de la Salud. Envejecimientos. Datos y cifras (2015). Disponible en: http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/es/. Consultado por última vez el 12 de enero de 2016.

Abades M y Rayón E. El envejecimiento en España: ¿un reto o problema social? (2012). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-928X2012004400002 Consultado por última vez el 5 de octubre de 2016.

INE. Proyección de la población a largo plazo 2009-2049. (2010). Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np587.pdf> Consultado por última vez el 5 de octubre de 2016.